

明細書

メチル化を利用したトランスジェニック生物を作製する方法およびシステム

5

技術分野

本発明は、細胞に外来核酸分子を導入するためのシステム、キット、組成物に関する。より詳細には、トランスジェニック生物の作製およびそのための組成物、キット、システムなどに関する。

10

背景技術

トランスジェニック生物は、その応用の範囲の広さから、現在非常に注目されている技術である。しかし、効率よくトランスジェニック生物を作製する方法は、それほど開発されておらず、そのようなトランスジェニック生物の効率よい作製方法の開発は注目されている。

15

最近、トランスポゾンがトランスジェニック生物の作製に応用することが試みられている。トランスポゾン（または、転移可能（*transposable*）エレメントとも呼ばれる）は、反復配列が並んだ核酸分子または配列である。トランスポザナーゼは、ある核酸分子への別の核酸の挿入を促進する酵素である。通常、トランスポザナーゼは、トランスポゾンの中にある。

20

トランスポゾンは、比較的広範な範囲の生物から見出されており、その現象は普遍的であると考えられている。転移はカット&ペースト形式により行われるとされている。脊椎動物でもトランスポゾンが発見されており（*Radice, A. D. et al., 1994. Mol. Gen. Genet. 244, 606-612*）、*Tc1/mariner*、*hAT (hobo/Ac/Tam)*などのスーパーファミリーに属するトランスポゾンが種々の生物（例えば、魚類、両

25

生類、哺乳動物を含む) から同定されている (Oosumi et al., 1995. Nature 378, 873; Ivics et al., 1995. Mol. Gen. Genet. 247, 312-322; Koga et al., 1996. Nature 383, 30; Lam et al., 1996. J. Mol. Biol. 257, 359-366、および Lam, W. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10870-10875)。トランスポザーゼは、トランスポゾンのもとあった位置からの切除および再組み込みを触媒または促進することが知られている (Plasterk, RHA., 1999. TIG 15:326-332; Plasterk RHA., 1996. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204, 125-143)。トランスポゾンの自律メンバーは、トランス作用性因子である活性トランスポザーゼを発現することができることから、自分自身が転移可能であるという性質も有する。非自律エレメントは、シス作用性因子であり得、この場合逆方向末端反復配列とも呼ばれる。一部の逆方向反復配列は、1または複数の直列反復配列を含む。このような配列は、末端逆方向反復配列 (IRs) 中に埋め込まれており、相補性トランスポザーゼの存在下で別のエレメントからの移動の用いられ得る。

このような系を用いて種々の生物において外来遺伝子の導入が試みられている。

植物では、Ac/Ds、Spmスーパーファミリーなどの転移可能エレメントが利用されており、すでに慣用的な技術となっている (Osborne and Baker, 1995. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 406-413)。動物でもまた、近年になって試みが行われている。ただし、エレメントには種特異性があり、なかなかうまくいかないことが多いといわれている。非ショウジョウバエ昆虫、ゼブラフィッシュ、哺乳動物などの細胞の遺伝子形質転換のための *Drosophila melanogaster* の

Pエレメントトランスポゾン利用の試みはうまくいっていない (H a n d l e r e t a l . , 1993. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22, 373-384; Gibbs et al. Mol. Mar. Biol. Biotech. 3, 317-326; および Rio et al. , 1988 J. Mol. Biol. 200, 411-415)。そこで、T c 1 / m a r i n e r スーパーファミリーに属するメンバーが種特異性をほとんど要求しないことから現在注目されており、ヒトなどの哺乳動物にまで応用が試みられている。このうち、M i n o s、T c Eなどもその応用が試みられている。

- 10 S l e e p i n g B e a u t y (S B) は、分子系統分類データベースを利用してサケ型T c 1 様トランスポゾン (S B) の転移を促進する活性として特定された。推定トランスポザースーゼ遺伝子の共通配列はまず8種類の魚由来のサケサブファミリー要素の不活性要素から推定し、そしてこのような要素を不活性にする変異を排除することにより操作されている。トランスポザースーゼを構築し、
- 15 その機能性ドメインを同定し、そして生化学的機能を個別におよび全長トランスポザースーゼの観点から試験した。トランスポザースーゼはサケ要素の逆方向反復配列内の2つの結合部位に結合し、そして基質特異性があり、そのことは近縁な魚類要素サブファミリー間での交差移動を阻止できうる。S Bトランスポザースーゼは魚類のみでなく、マウスおよびヒト細胞における操作トランスポゾンの染色体組込みを有意に高める。トランスポザースーゼにおける特異的なモチーフのための要件および標的トランスポゾン内の特異的な配列は、魚類および哺乳動物細胞等における活性と共に、S Bトランスポザースーゼを脊椎動物における生殖系形質転換および挿入式変異誘発のための最初の活性DNAトランスポゾンシステムとして確立する。本発明の一の観点において、本発明は核酸フラグメント
- 20 であって：少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含んで成り、その逆方向反復配列がS Bタンパク質に結合でき、そしてその核酸フラ

グメントが細胞中のDNAは組込まれることのできる核酸フラグメントに関連する。一の態様において、細胞は動物、例えば無脊椎動物または脊椎動物から入手する。好適な無脊椎動物には甲殻類または軟体動物、例えば限定することなく、エビ、ホタテ、ロブスター、ハマグリまたはカキが含まれる。好適な脊椎動物の態様には魚類、鳥類、ならびに哺乳動物、例えばマウス、有蹄類、ヒツジ、ブタおよびヒトから成る群より選ばれるものが挙げられる。細胞のDNAは細胞ゲノムまたは染色体外DNA、例えばエピソードまたはプラスミドであってよい。

DNAを細胞に導入するための方法は知られており、例えば、DNA凝縮試薬（例えばリン酸カルシウム、ポリエチレングリコール等）、脂質含有試薬（例えばリポソーム、多重層小胞体など）およびウイルス媒介法などがある。これらの方法は全てそれ自身の制約をもつ。例えば、DNA凝縮試薬およびウイルス媒介法には、サイズが限定されるという欠点がある。核酸量もまた制約される。導入核酸の組み込みの促進もまた効率がよいというわけではない。

細胞にDNAを導入するための新しい方法、特に細胞の核酸の中への様々なサイズの核酸フラグメントの効率的な組み込み、特に細胞のゲノムへのDNAの組み込みを促進する方法のニーズが残っている。

Z. Ivics et al.; Cell, 91:501-510 (1997) は、培養細胞でのトランスポゾンシステムの発現を報告しており、成熟した哺乳動物個体またはその臓器、器官等ではトランスポゾンシステムの効果は確認されていない。動物細胞においては、ショウジョウバエの亜種 *Drosophila mauritiana* から *mariner* トランスポゾンが単離され、これを用いてベクターが構築されている。

例えば *Drosophila melanogaster* のP因子トランスポゾンを用いて種々の異種生物染色体DNAへの組み込みが試みられたが、種特異性の理由から、P因子ベクターの機能は維持されなかった。Drosop

h i I a 以外のイエバエ、ハヤトビバエ、ノミバエなどのハエを用いた実験では、いずれの場合も P 因子の転移活性が維持されなかった (H a n d l e r e t a l.; Arch. Insect Biochem Physiol., 22: 373-384 (1993))。P 因子およびリポーター遺伝子が組み込まれたトランスジェニックゼブラフィッシュは、遺伝的に安定した発現が得られ
5 なかった (G i b b s e t a l.; Mol. Mar. Biol. Biotech., 3: 317-326 (1994))。最も研究された真核生物トランスポゾンである Tc1/mariner トランスポゾン を異種生物で用いた場合、それらの種特異性は比較的 low 転移が起こり易いことが知られている (Z. I
10 v i c s e t a l. Cell, 91: 501-510 (1997))。この Tc1/mariner-like トランスポゾンより再構築されるトランスポゾンおよびトランスポザラーゼを含むトランスポゾンシステムの例に、SB トランスポゾンおよび SB トランスポザラーゼを含む前記 S l e e p i n g B e a u t y (SB) t r a n s p o s o n s y s t e m がある。この SB ト
15 ランスポゾン をヒトの H e L a 細胞およびマウスの L M T K 細胞へ導入した例 (Z. I v i c s e t a l.; Cell, 91: 501-510 (2000))、マウスの胚性幹 (e m b r y o n i c s t e m : E S) 細胞へ導入した例 (A. L u o. e t a l.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 10760-10773 (1998))・ヒト培養細胞に導入した線虫 (C a e n o r a b d i t i s e l e g a n s) 由来 Tc1 トランスポゾンに活性がみられた例 (G. S c h o u t e n e t a l. N u c l e i c A c i d s R e s., 26: 3013-3017 (1998)) が報告されている。
20 しかしながら、例えばマウスの胚性幹細胞へ SB トランスポゾン を導入した上記例においては、トランスポゾンの転移頻度は外来遺伝子が導入された細胞あたり最大でも 1 世代の 1 細胞あたり 3.5×10^{-5} 回と極めて低く、所望の細胞を得るためには大量の細胞を扱う必要があった。また、ヒト H e L a 培養細胞

胞に導入した例は、動物個体には適用できない。哺乳動物におけるトランスポ
ゾンの導入については、SBトランスポゾンおよびSBトランスポザーゼ遺伝
子を体細胞ゲノム中に血液を介して導入して得られる。トランスポゾンが転移
したマウス (SR Yant et al. Nature Genetics,

5 25 : 35 : 41

(2000)) が報告されている。しかしながら、この場合のトランスポゾン転
移頻度は、該遺伝子が導入された肝臓細胞中わずか約5-6%であり、この方
法では遺伝子導入の効率が悪く、系統的にトランスジェニック動物を得ること
もできない。また、これまでの方法では、1動物個体の体内で数多くの遺伝子
10 にランダムに変異を導入することが困難であり、その発現頻度も低いものであ
った。従って、遺伝子変異誘発のための一般的な方法を設計する必要があった。

従って、上述のように、これらのSBなどを用いても、細胞レベルで遺伝子
を導入しようとした場合に、首尾よく行かない場合が多く、形質転換効率を上
15 げることが課題となっている。

本発明は、形質転換効率をさらに上げるトランスポゾン系を開発し、トラン
スジェニック生物の生産をより効率よく行うことを課題とする。

20 発明の要旨

上記課題は、上記状況にかんがみ、鋭意研究を重ねた結果、部分的には、導
入する核酸配列の少なくとも一部をメチル化することによって、予想外に形質
転換効率が上昇したことを見出したことによって解決される。

25 本発明は、トランスポゾンを用いて外来遺伝子を効率よく細胞に導入する技
術に関する。より詳細には、本発明は、トランスポゾンを含む配列をメチル化

することによって、トランスポゾンの転移活性を飛躍的に向上させ、効率よく
トランスジェニック生物を作製する技術に関する。メチル化は、ゲノムに組み
込まれた後も保持されており、実際のゲノムへの遺伝子の組み込みにも利用す
ることが可能になった。本発明を用いれば、従来のトランスポゾンを用いたト
5 ランスジェニック生物の作製方法よりも、格段に効率よく遺伝子を形質転換す
ることができる。

従って、本発明は、以下を提供する。

(1) トランスポゾンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子
10 であって、上記核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されて
いる、単離された核酸分子。

(2) さらに、所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する、項目1に記載
の単離された核酸分子。

(3) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、
15 項目1に記載の単離された核酸分子。

(4) 上記トランスポゾンはDNA型である、項目1に記載の単離された核
酸分子。

(5) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目1に
記載の単離された核酸分子。

20 (6) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目
1に記載の単離された核酸分子。

(7) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、
または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結され得る、
項目2に記載の単離された核酸分子。

25 (8) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目1に記載の単
離された核酸分子。

(9) 上記宿主は、真核生物を含む、項目 8 に記載の単離された核酸分子。

(10) 上記宿主は、哺乳動物を含む、項目 8 に記載の単離された核酸分子。

(11) 上記宿主は、げっ歯類を含む、項目 8 に記載の単離された核酸分子。

5 (12) 上記核酸分子が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザー
ゼが作用する、項目 1 に記載の単離された核酸分子。

(13) トランスポゾンにコードする核酸配列を有する遺伝子カセットであ
って、上記核酸配列は、少なくとも 1 つのヌクレオチドがメチル化されている、
遺伝子カセット。

10 (14) トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコー
ドする核酸配列を有するベクターであって、上記核酸配列は、少なくとも 1 つ
のヌクレオチドがメチル化されている、ベクター。

(15) 上記メチル化は、少なくとも、CG 配列における C において存在す
る、項目 14 に記載のベクター。

(16) 上記トランスポゾンは DNA 型である、項目 14 に記載のベクター。

15 (17) 上記トランスポゾンは T c 1 / m a r i n e r 型に属する、項目 1
4 に記載のベクター。

(18) 上記トランスポゾンは S l e e p i n g B e a u t y を含む、項
目 14 に記載のベクター。

20 (19) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結される
か、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結され得
る、項目 14 に記載のベクター。

(20) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目 14 に記載
のベクター。

(21) 上記細胞は、真核生物細胞を含む、項目 20 に記載のベクター。

25 (22) 上記細胞は、哺乳動物細胞を含む、項目 20 に記載のベクター。

(23) 上記細胞は、げっ歯類細胞を含む、項目 20 に記載のベクター。

(24) 上記核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用する、項目14に記載のベクター。

(25) ゲノム上に挿入される外来核酸分子に対してトランスポザーゼを作用させるための組成物であって、上記組成物は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および上記外来核酸分子を含み、上記トランスポゾンにコードする配列はメチル化されている、組成物。

(26) トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む細胞であって、上記核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、細胞。

10 (27) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目26に記載の細胞。

(28) 上記トランスポゾンはDNA型である、項目26に記載の細胞。

(29) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目26に記載の細胞。

15 (30) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目26に記載の細胞。

(31) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結され得る、項目26に記載の細胞。

20 (32) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目26に記載の細胞。

(33) 上記細胞は、真核生物細胞を含む、項目26に記載の細胞。

(34) 上記細胞は、哺乳動物細胞を含む、項目26に記載の細胞。

(35) 上記細胞は、げっ歯類細胞を含む、項目26に記載の細胞。

25 (36) トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む組織であって、上記核酸配列は、少な

くとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、組織。

(37) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目36に記載の組織。

(38) 上記トランスポゾン DNA型である、項目36に記載の組織。

5 (39) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目36に記載の組織。

(40) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目36に記載の組織。

10 (41) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結される、項目36に記載の組織。

(42) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目36に記載の組織。

(43) 上記組織は、真核生物組織を含む、項目42に記載の組織。

15 (44) 上記組織は、哺乳動物組織を含む、項目42に記載の組織。

(45) 上記組織は、げっ歯類組織を含む、項目42に記載の組織。

(46) トランスポゾンをコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む生物であって、上記核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、生物。

20 (47) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目46に記載の生物。

(48) 上記トランスポゾンはDNA型である、項目46に記載の生物。

(49) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目46に記載の生物。

25 (50) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目46に記載の生物。

(5 1) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結される、
項目 4 6 に記載の生物。

(5 2) 上記生物は、真核生物を含む、項目 4 6 に記載の生物。

(5 3) 上記生物は、哺乳動物を含む、項目 4 6 に記載の生物。

5 (5 4) 上記生物は、げっ歯類を含む、項目 4 6 に記載の生物。

(5 5) 上記所望の遺伝子は、上記生物に由来しない、項目 4 6 に記載の生物。

(5 6) トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

10 A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を
提供する工程；

B. 上記核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；

C. 上記生殖細胞において上記トランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択する工程；

15 D. 形質転換された上記生殖細胞を用いて生物を再生する工程、
を包含する、方法。

(5 7) 上記生物は、真核生物を含む、項目 5 6 に記載の方法。

(5 8) 上記生物は、哺乳動物を含む、項目 5 6 に記載の方法。

(5 9) トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

20 A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子で
あって、上記核酸配列は、少なくとも 1 つのヌクレオチドがメチル化されている、
単離された核酸分子を提供する工程；

B. 上記核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；ならびに

C. 形質転換された上記生殖細胞を用いて生物を再生する工程、
を包含する、方法。

25 (6 0) 上記生物は、真核生物を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(6 1) 上記生物は、哺乳動物を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(62) 上記生物は、げっ歯類を含む、項目59に記載の方法。

(63) トランスジェニック生物を作製するためのキットであって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、上記核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子；

B. トランスポザゼ、を包含する、キット。

(64) さらに、上記核酸分子およびトランスポザゼの使用法を記載する説明書を含む、項目63に記載のキット。

(65) トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、上記核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子の、トランスジェニック生物の作製のための使用。

(66) 少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トランスポザゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント。

(67) 上記核酸配列は、外来遺伝子の少なくとも一部を含む、項目66に記載の核酸フラグメント。

(68) 上記核酸配列は、少なくとも一つの発現制御領域を含む、項目66に記載の核酸フラグメント。

(69) 上記発現制御領域は、プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサーからなる群より選択される、項目68に記載のフラグメント。

(70) 外来遺伝子の少なくとも一部をさらに含み、上記核酸配列は、上記外来遺伝子の少なくとも一部をコードする配列と作動可能に連結される、項目66に記載の核酸フラグメント。

(71) 上記細胞は、動物由来である、項目66に記載の核酸フラグメント。

(72) 上記細胞が脊椎動物から得られたものである、項目71に記載の核

酸フラグメント。

(73) 上記脊椎動物は、哺乳動物である、項目72に記載の核酸フラグメント。

5 (74) 上記哺乳動物は、霊長類またはげっ歯類である、項目73に記載の核酸フラグメント。

(75) 上記細胞のDNAは、細胞ゲノム、エピソームおよびプラスミドからなる群より選択される、項目66に記載される核酸フラグメント。

(76) 上記少なくとも1つの逆方向反復配列は、配列番号20もしくは21、またはその一部を含む、項目66に記載の核酸フラグメント。

10 (77) 上記トランスポザゼは、SBタンパク質である、項目66に記載の核酸フラグメント。

(78) 上記トランスポザゼは、配列番号3に対して少なくとも80%のアミノ酸相同性を有する、項目77に記載の核酸フラグメント。

15 (79) 上記少なくとも1つの逆方向反復配列が少なくとも1つの直列反復配列を含み、上記直列反復配列は、配列番号26に記載される塩基配列または上記塩基配列に対して少なくとも80%相同な塩基配列を含む、項目66に記載の核酸フラグメント。

20 (80) 上記少なくとも1つの逆方向反復配列が少なくとも1つの直列反復配列を含み、上記直列反復配列は、配列番号22～25に記載される核酸配列からなる群より選択される、項目66に記載の核酸フラグメント。

(81) 細胞中のDNAに別のDNAを導入するための核酸導入システムであって、上記システムは：

25 (A) 少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トランスポザゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント；お

よび

(B) トランスポザーゼまたはトランスポザーゼをコードする核酸、
(を含む、核酸導入システム。

5 (82) 上記トランスポザーゼは、S Bタンパク質である、項目81に記載
の核酸導入システム。

(83) 上記トランスポザーゼは、配列番号3に記載されるアミノ酸配列ま
たはその改変体を有するか、または上記トランスポザーゼをコードする核酸配
列は、配列番号2に記載される核酸配列またはその改変体を有する、項目81
に記載の核酸導入システム。

10 (84) 上記トランスポザーゼをコードする核酸は、細胞ゲノムに組み込ま
れる、項目81に記載の核酸導入システム。

(85) プラスミドまたはウイルスベクターをさらに含み、上記プラスミド
またはウイルスベクターは、上記核酸フラグメントをその一部として含む、項
目81に記載の核酸導入システム。

15 (86) 上記核酸フラグメントは、外来遺伝子をコードする配列の少なくと
も一部を含む、項目81に記載の核酸導入システム。

(87) 上記核酸フラグメントは、上記細胞の中に、粒子ボンバードメント；
エレクトロポレーション；マイクロインジェクション；遺伝子導入試薬の利用；
およびウイルスベクターの利用からなる群より選択される方法を用いて導入さ
20 れる、項目81に記載の核酸導入システム。

(88) トランスジェニック生物を生産するための方法であって、

核酸フラグメントおよびトランスポザーゼを多能性細胞に導入する工程であ
って、上記核酸フラグメントは、少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置
する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トラ
25 ンスポザーゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、細胞内のDN
Aに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化され

た核酸フラグメントである、工程；

上記細胞を生物体へと成長させる工程；

を包含する、方法。

- (89) 上記多能性細胞は、卵母細胞、胚細胞、卵および幹細胞からなる群より選択される、項目88に記載の方法。

(90) 上記生物は、げっ歯類または霊長類である、項目88に記載の方法。

(91) 上記生物は、マウスまたはラットである、項目89に記載の方法。

(92) 核酸を細胞中のDNAに導入するための方法であって、

- 核酸フラグメントを細胞に導入する工程であって、上記核酸フラグメントは、少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、上記トランスポザーゼの存在下で細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメントである、工程、

- 15 を包含する、方法。

(93) さらに、トランスポザーゼを上記細胞中に導入する工程を包含する、項目92に記載の方法。

(94) 上記トランスポザーゼは、配列番号3と少なくとも80%の相同性を有する、項目92に記載の方法。

- 20 (95) 上記細胞は、上記トランスポザーゼをコードする核酸を含む、項目92に記載の方法。

(96) 上記トランスポザーゼをコードする核酸は、細胞ゲノムに組み込まれる、項目95に記載の方法。

- 25 (97) 上記トランスポザーゼは、細胞中で安定に発現される、項目95に記載の方法。

(98) 上記トランスポザーゼは、誘導性プロモーターに制御下にあるよう

に作動可能に連結される、項目 9 5 記載の方法。

(9 9) 上記核酸配列は、タンパク質をコードする、項目 9 2 に記載の方法。

(1 0 0) 上記核酸配列は、マーカータンパク質をコードする、項目 9 2 に記載の方法。

5 (1 0 1) 細胞内の核酸配列を移動させるための方法であって：

少なくとも 2 つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トランスポザアーゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、細胞内の DNA に組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント、を含む細胞

10 胞の中に、トランスポザアーゼを導入する工程、

を包含し、上記トランスポザアーゼは、上記細胞の DNA 中の第一の位置から上記 DNA の第二の位置に上記核酸配列を移動させる、

方法。

(1 0 2) 上記細胞の DNA は、ゲノム DNA である、項目 1 0 1 に記載の方法。

(1 0 3) 上記第一の位置は、染色体外 DNA である、項目 1 0 1 に記載の方法。

(1 0 4) 上記第二の位置は、染色体外 DNA である、項目 1 0 1 に記載の方法。

20 (1 0 5) 上記トランスポザアーゼは、上記細胞中に核酸として導入する、項目 1 0 1 に記載の方法。

(1 0 6) 細胞内の遺伝子を同定するための方法であって：

少なくとも 2 つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トランスポザアーゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、細胞内の DNA に組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント、およびト

ランスポザーゼを、細胞の中に導入する工程；

上記細胞中のDNAを、上記核酸配列を切断することができる制限エンドヌクレアーゼで消化する工程；

上記逆方向反復配列を同定する工程；

- 5 上記逆方向反復配列に近い核酸の配列を決定する工程；および
 上記配列と配列情報データベース内の配列情報と比較する工程、
 を包含する、方法。

図面の簡単な説明

- 10 図1は、高頻度の転移が、CpGメチル化に関連することを示す。

図1Aは、挿入型相同組換えによる単一コピーのSpt1c2遺伝子座へのSBトランスポゾンの導入およびPCRによるトランスポゾン切り出しの検出。
 白い四角：エキソン、黒三角：LoxP部位、灰色および白の矢印：ネステッドPCRプライマー、薄い線：プラスミドの骨格配列、CAG：CAGプロモーター、IR/DR-RおよびIR/DR-L：それぞれ、右IR/DRおよび左IR/DR、Xb：XbaI、B：BamHI、K：KpnI。

15

図1Bは、ES細胞のSpt1c2遺伝子座でのSBトランスポゾンの切り出しを示す。Spt1c2遺伝子座に標的化して挿入したSBトランスポゾンを有するES115クローン（パネルAに示す）を、段階希釈した野生型のSBトランスポザーゼ（トランスポザーゼ+）を発現するpSB10または、DEボックスが欠損した不活性のSBトランスポザーゼ（トランスポザーゼ-）を発現するpSB10-DDE（Ivics, Z., P. B. Hackett, R. H. Plasterk, およびZ. Izsvak. 1997; Cell 91: 501~510）でトランスフェクトし、パネルAに示すように、ネステ

20

25

イッドPCRでスクリーニングした。pSB10の各希釈因子について4つの
 独立したトランスフェクションを行い、8つの独立したPCRの1反応あたり
 1 μ gのゲノムDNAを使用して、各トランスフェクションにおいて8 μ gの
 ゲノムDNAをスクリーニングした。pSB10の最大量(2 μ g)を有する
 5 代表的なPCRの結果を左のパネルに示す。各トランスフェクションについて
 の陽性PCRの平均数およびSBトランスポザーゼの発現レベルのRT-PCR
 分析の結果を右のパネルに示す。Actb: β -アクチン。

図1Cは、雄マウスの生殖細胞およびES細胞におけるトランスポゾン配列
 10 内のメチル化状態のサザンブロット分析。EGFPをプローブとして使用した。
 生殖細胞由来のゲノムDNAは、HpaIIで消化されなかった。これは、こ
 の部位がメチル化ことを示す。一方、ES115クローン由来のゲノムDNA
 は、ほとんど完全に消化された。かすかなバンドの存在(アスタリスクで示す)
 は、ES細胞において、HpaII部位の小画分がメチル化ことを示す。黒丸:
 15 HpaII (H) またはMspI (M) 部位、X: XhoI 部位。KM、KX
 MおよびKXHレーンにおけるHpaII-MspIフラグメント由来の0.
 5 kbのバンドを矢印で示す。

図1Dは、一過性トランスポゾン切り出しアッセイの結果を示す。

20 a) 実験方法を示す。トランスポゾンDNA (pTransCX-EGFP:
 neo, Horie et. al. PNAS, 2001) を、SssI Cp
 Gメチラーゼにて、あらかじめメチル化しておく。マウス赤白血病細胞 (ME
 L cell) に、トランスポゾンDNA とSleeping Beauty
 (SB) 転移酵素とともに導入する。細胞から全DNAを抽出し、プラスミ
 25 ドベクター上のプライマーを用いてPCR を行い、切り出し反応が起こった
 時に増幅される358bpのPCR産物を検出する。

b) PCRの結果を示す。メチル化したトランスポゾン転移酵素と共に導入した細胞において、メチル化していないトランスポゾンよりも、高頻度に切り出し反応が起きていた。

略号 CAG : CAGプロモーター、EGFP : 緑色蛍光タンパク質、p
5 A : ポリA 付加シグナル、L : 左IR/DR、R : 右IR/DR、M : メチル化、N : 非メチル化、NC : ネガティブコントロール (MEL cell ゲノムDNA)。

10 図2は、マウスゲノムの同一遺伝子座にメチル化または非メチル化のトランスポゾンを有する細胞の樹立の様子を示す図である。Aは、例示的実験のフローチャートを示す。Bは、サザンブロット分析を示す。C~Dは、メチル化の維持を確認する実験結果例である。図2dは、所定のゲノムの遺伝子座にメチル化SBトランスポゾンまたは非メチル化SBトランスポゾンを有する細胞の
15 生成を示す

図2Eは、標的クローンにおけるEGFP発現の、蛍光細胞分析分離装置 (FACS) 分析。灰色の領域 : 野生型の細胞、薄い線 : 標的クローン。

20 図3Aは、マウスゲノムにおける、DNAメチル化のトランスポゾン切り出し反応への効果を示す一例である。

図3B~Cは、所定のゲノムの遺伝子座でのメチル化SBトランスポゾンの高頻度の切り出しの詳細を示す。一部は、図3Aと重複する。

図2に示すクローンからの1 μ gまたは10 ngをネステッドPCRのための鋳型として使用した。各クローンについて、10のPCRを行った。(B) 25 方向D ; (C) 方向I。NC : ネガティブコントロールとしてのトランスフェクトしていないゲノムDNA、M : 100 bp ラダー。トランスポゾン領域の

メチル化状態および親クローンを、右に示す。

図4は、トランスポゾンのゲノムへの挿入に及ぼす効果を示す例である。Aは、例示的に使用されるプラスミド構成を示す。Bにおいて、左はメチル化および右は非メチル化のものを示す。

図4Bは、SB転移に及ぼすCpGメチル化の影響を示す。3つの独立したトランスフェクションに対し、培養皿あたりのG418耐性コロニーの平均数を右に示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

図4Cは、トラップした遺伝子の構造およびトランスポゾン挿入部位。挿入部位を黒矢印で示す。クローンM1～M4は、メチル化トランスポゾンでのトランスフェクション由来であり、クローンN1～N6は、非メチル化トランスポゾン由来である。染色体の数、Ensembl遺伝子デシグネーター、および遺伝子名もまた示す。2つの挿入部位（M2SおよびM2Lと示される）が特徴付けされたクローンM2を除いて、各クローンにおいて1つの挿入部位を同定した。いくつかのクローン（M2S、M2L、M4およびN1）における正確なスプライシングは、上流のエキソン（白い矢印）およびトランスポゾンに対するプライマーを用いるRT-PCRによって確認した。黒四角：エキソン。5キロベースのスケールバーを右に示す。

図4Dは、Tc転移に及ぼすメチル化の影響。トラップベクターの構造を上部に示す。TIR：末端逆方向反復。3つの独立したトランスフェクションについて、ディッシュあたりのG418耐性コロニーの平均数を底部に示す。

図5（A～F）は、代表的なトランスポゾンの配列のアラインメントである。X01005（1～1610）、Z29098（15～1787）、Z29102（15～1787）、U11641（188～1451）、U11652（146～1442）、L48685（1～1455）のマルチプルアライメント [丸

括弧内の数字は、各登録番号の配列における塩基範囲を示す]。

図6は、裸のメチル化IR/DRに対するSBトランスポザーゼDNA結合ドメインの不変の親和性を示す。

- 5 図6Aは、IR/DRにおけるCpG部位およびトランスポザーゼ結合部位の模式図。黒丸：CpG部位。

図6B～Eは、組換えSBトランスポザーゼペプチド(N123)での電気泳動移動度シフトアッセイ(Electrophoretic-Mobility Shift Assay = EMSA)を示す。

- 10 図6BおよびCは、IR/DR-Lの34bpの外側結合部位で得られた結果であり、図6DおよびEは、300bpのIR/DR-Lフラグメントで得られた結果である。

- 図6Bに示すように、非メチル化またはメチル化外側結合部位を増大する濃度のN123ペプチド(1600～100倍希釈の精製ペプチド)と混合し、
15 核タンパク質複合体を形成した。

図6Cに示すように、非メチル化外側結合部位をプローブとして標識化し、非メチル化外側結合部位またはメチル化外側結合部位を、増大する濃度で(1～50倍のモル過剰のプローブ)競合物質として使用した。

- 図6Dに示すように、非メチル化IR/DR-Lフラグメントまたはメチル化IR/DR-Lフラグメントを、核タンパク質複合体の形成のために、増大する濃度のN123ペプチド(5100～160倍希釈の精製ペプチド)と混合した。
20

- 図6Eに示すように、非メチル化IR/DR-Lフラグメントをプローブとして標識化し、非メチル化またはメチル化のIR/DR-Lフラグメントを、
25 増大する濃度(500～8000倍モル過剰のプローブ)で、競合物質として使用した。Unmet：非メチル化、Met：メチル化、F：遊離プローブ、

C：複合体。複合体1（C1）およびC2は、それぞれ、IR/DRあたりのN123ペプチドの1および2分子の結合を示す（Ivics, Z., P. B. Hackett, R. H. Plasterk, およびZ. Izsvak. 1997; Cell 91:501~510）。

5

図7は、所定の遺伝子座でのメチル化トランスポゾンまたは非メチル化トランスポゾンのChIPアッセイを示す。

図7Aは、ChIPアッセイにおいて分析されたSBトランスポゾン領域。PCR増幅領域を各成分の下の薄い線として示す。黒三角：lox511部位。

- 10 図7BおよびCは、沈降したDNAのPCR分析。図3および4に示すように、クローン5M3および5U3（B）ならびにクローン6M11および6U1（C）を、それぞれ、親クローンRL5およびRL6から誘導した。投入および沈降したDNAの5倍段階希釈を分析した。AcH3：抗アセチルH3、MeH3K9：抗トリメチル化H3K9、no Ab：抗体を含まないコントロール。アミラーゼ2.1およびβ-小グロビンを、異色領域かつ真性染色質領域に対する代表的なコントロールとして使用した。アミラーゼ2.1およびβ-小グロビンのバンドの強度は5M3の抗アセチルH3画分において同じであるが、投入DNAにおけるアミラーゼ2.1配列のより高い増幅効率は、β-小グロビン配列が、この画分においてアミラーゼ2.1配列と比較して富化
- 15 されることを示す。抗体を含まないコントロールのレーンに見られるかすかなバンドは、タンパク質に対するゲノムDNAの非特異的な結合由来である。アガロースビーズを調製に使用した。定量は2回行い、代表的な結果を示す。
- 20

25 図中、「GFP」はGFP遺伝子を意味する。本明細書では、ときに、Sleeping Beauty（SB）トランスポゾンシステムにおけるトランスポゾンはSBトランスポゾン、トランスポザーゼはSBトランスポザーゼと記

載される。一方、図中においては、「SB」はSleeping Beauty
トランスポザーゼ遺伝子を意味する。

(配列表の説明)

- 5 配列番号1 : SB (Sleeping Beauty) トランスポゾンDNA
の配列 (GENBANK登録番号L48685)。
配列番号2 : SBトランスポザーゼの核酸配列。
配列番号3 : SBトランスポザーゼのポリペプチド配列。
配列番号4 : 左外側反復の核酸配列。
- 10 配列番号5 : 左内側配列の核酸配列。
配列番号6 : TgTP-1Uの核酸配列。
配列番号7 : TgTP-2Lの核酸配列。
配列番号8 : TgTP-2Uの核酸配列。
配列番号9 : TgTP-3Lの核酸配列。
- 15 配列番号10 : Caenorhabditis elegans由来の転移性
要素Tc1の核酸配列 (GENBANK登録番号X01005)。
配列番号11 : Caenorhabditis elegans由来の転移性
要素Tc1のアミノ酸配列 (GENBANK登録番号X01005)。
配列番号12 : Drosophila hydei由来のMinos-2の核
20 酸配列 (GENBANK登録番号Z29098)。
配列番号13 : Drosophila hydei由来のMinos-2のア
ミノ酸配列 (GENBANK登録番号Z29098)。
配列番号14 : Drosophila hydei由来のMinos-3の核
酸配列 (GENBANK登録番号Z29102)。
- 25 配列番号15 : Drosophila hydei由来のMinos-3のア
ミノ酸配列 (GENBANK登録番号Z29102)。

配列番号16: *Haematobia irritans* 由来の Hi 2 mariner の核酸配列 (GENBANK登録番号U11641)。

配列番号17: *Haematobia irritans* 由来の Hi 2 mariner のアミノ酸配列 (GENBANK登録番号U11641)。

5 配列番号18: *Chrysoperla plorabunda* 由来の mariner の核酸配列 (GENBANK登録番号U11652)。

配列番号19: *Chrysoperla plorabunda* 由来の mariner のアミノ酸配列 (GENBANK登録番号U11652)。

配列番号20: IR/DR-R の配列を示す: a a t t c c a t c a c a a a g c t
10 c t g a c c t c a a t c c t a t a g a a a g g a g g a a t g a g c c a
a a a t t c a c c c a a c t t a t t g t g g g a a g c t t g t g g a a
g g c t a c t c g a a a t g t t t g a c c c a a g t t a a a c a a t t
t a a a g g c a a t g c t a c c a a a t a c t a a t t g a g t g t a t
g t t a a c t t c t g a c c c a c t g g g a a t g t g a t g a a a g a
15 a a t a a a a g c t g a a a t g a a t c a t t c t c t a c t a t t
a t t c t g a t a t t t c a c a t t c t t a a a a t a a a g t g g t g
a t c c t a a c t g a c c t t a a g a c a g g g a a t c t t t a c t c
g g a t t a a a t g t c a g g a a t t g t g a a a a a g t g a g t t t
a a a t g t a t t t g g c t a a g g t g t a t g t a a a c t t c c g a
20 c t t c a a c t g t a。

配列番号21: IR/DR-L の配列: c c t t g a a a t a c a t c c a c
a g g t a c a c c t c c a a t t g a c t c a a a t g a t g t c a a t t
a g t c t a t c a g a a g c t t c t a a a g c c a t g a c a t c a t t
t t c t g g a a t t t t c c a a g c t g t t t a a a g g c a c a g t c
25 a a c t t a g t g t a t g t a a a c t t c t g a c c c a c t g g a a t
t g t g a t a c a g t g a a t t a t a a g t g a a a t a a t c t g t c

t g t a a a c a a t t g t t g g a a a a t g a c t t g t g t c a t g
 c a c a a a g t a g a t g t c c t a a c t g a c t t g c c a a a a c t
 a t t g t t t g t t a a c a a g a a a t t t g t g g a g t a g t t g a
 a a a a c g a g t t t t a a t g a c t c c a a c t t a a g t g t a t g
 5. t a a a c t t c c g a c t t c a a c t g t a。

配列番号 2 2 : 逆方向反復配列の反復部分の例 : g t t c a a g t c g g
 a a g t t t a c a t a c a c t t a g 。

配列番号 2 3 : 逆方向反復配列の反復部分の例 : c a g t g g g t c a g a
 a g t t t a c a t a c a c t a a g g 。

10 配列番号 2 4 : 逆方向反復配列の反復部分の例 : c a g t g g g t c a g a
 a g t t a a c a t a c a c t c a a t t 。

配列番号 2 5 : 逆方向反復配列の反復部分の例 : a g t t g a a t c g g a
 a g t t t a c a t a c a c c t t a g 。

配列番号 2 6 : 逆方向反復配列の反復部分の共通部分例 : c a k t g r g t c
 15 r g a a g t t t a c a t a c a c t t a a g 。

配列番号 2 7 : 左外側反復の例

配列番号 2 8 : 左内側反復の例

配列番号 2 9 : p CMV-SBからのPCR増幅に使用する順向き配列

配列番号 3 0 : p CMV-SBからのPCR増幅に使用する逆向き配列

20 配列番号 3 1 : プライマーEGFP-1 U

配列番号 3 2 : プライマーEGFP-1 L

配列番号 3 3 : プライマーHYG-1 U

配列番号 3 4 : プライマーTK-1 L

配列番号 3 5 : プライマーM13 F

25 配列番号 3 6 : プライマーRMCE-DL 1

配列番号 3 7 : プライマーRRMCE-IL-1

- 配列番号 38 : プライマー T g T P - 2 L
- 配列番号 39 : プライマー n e o - U 1
- 配列番号 40 : プライマー n e o - L 1
- 配列番号 41 : 切り出し産物に対する蛍光標識化プローブ
- 5 配列番号 42 : 切り出し産物に対する蛍光標識化プローブ
- 配列番号 43 : n e o フラグメントに対する蛍光標識プローブ
- 配列番号 44 : n e o フラグメントに対する蛍光標識プローブ
- 配列番号 45 : 切り出し産物に対する P C R プライマー
- 配列番号 46 : 切り出し産物に対する P C R プライマー
- 10 配列番号 47 : n e o フラグメントに対する P C R プライマー
- 配列番号 48 : n e o フラグメントに対する P C R プライマー
- 配列番号 49 : プライマー L C B 2 X L 2
- 配列番号 50 : プライマー P G K 2
- 配列番号 51 : プライマー L C B 2 X L 1
- 15 配列番号 52 : プライマー P G K 4
- 配列番号 53 : S B トランスポザーゼ遺伝子の増幅のための順向きプライマー
- 配列番号 54 : S B トランスポザーゼ遺伝子の増幅のための逆向きプライマー
- 配列番号 55 : β -アクチントランスポザーゼ遺伝子の増幅のための順向きプライマー
- 20 配列番号 56 : β -アクチントランスポザーゼ遺伝子の増幅のための逆向きプライマー
- 配列番号 57 : プライマー β -g e o
- 配列番号 58 : M 2 S に特異的なプライマー
- 配列番号 59 : M 2 L に特異的なプライマー
- 25 配列番号 60 : M 4 に特異的なプライマー
- 配列番号 61 : N 1 に特異的なプライマー

配列番号 62 : U n m e t - U

配列番号 63 : U n m e t - L

配列番号 64 : M e t - U

配列番号 65 : M e t - L

5 配列番号 66 : アミラーゼ 2. 1 遺伝子のための順向きプライマー

配列番号 67 : アミラーゼ 2. 1 遺伝子のための逆向きプライマー

配列番号 68 : β -小グロビン遺伝子のための順向きプライマー

配列番号 69 : β -小グロビン遺伝子のための逆向きプライマー

配列番号 70 : I R / D R - L のための順向きプライマー配列

10 配列番号 71 : I R / D R - L のための逆向きプライマー配列

配列番号 72 : I R / D R - R のための順向きプライマー配列

配列番号 73 : E G F P - 1 U プライマー

配列番号 74 : E G F P - 1 L プライマー

配列番号 75 : S B - 2 U プライマー

15 配列番号 76 : S B - 1 L プライマー

発明の実施の形態

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従
20 って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、
独語の場合の「ein」、「der」、「das」、「die」などおよびその格変
化形、仏語の場合の「un」、「une」、「le」、「la」など、スペイン語に
おける「un」、「una」、「el」、「la」など、他の言語における対応する
冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むこと
25 が理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言
及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解される

べきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

5

（用語の定義および説明）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

本明細書において「トランスポゾン」とは、染色体上のある部位から別の部位に移動（転移）し得る核酸分子または核酸配列をいう。代表的には、トランス
10 スポゾンは、DNAセグメント（DNA型トランスポゾン）である。DNA型トランスポゾンは、トランスポザラーゼにより活性化されて転移する。トランスポゾンとしては、例えば、SBトランスポゾン（Acc. No. L48685）（配列番号1）、配列番号10～19に示す配列に含まれるものが挙げられるがそれらに限定されない。

15

本明細書において「トランスポザラーゼ」とは、トランスポゾンを認識してその配列を転移させる触媒活性を有する酵素をいう。トランスポザラーゼとしては、例えば、SBトランスポザラーゼ（配列番号2、3）、配列番号10～19に示す配列に含まれるものなどに示されるものが挙げられるがそれらに限定されない。

20

本発明において、トランスジェニック生物に用いられるトランスポゾン配列およびトランスポザラーゼ遺伝子は、内因性のものでも外来性のものでも制限なく使用することができるが、好ましくは外来性のトランスポゾン配列およびトランスポゼース遺伝子を用いることができる。

25 トランスポゾンは、通常両末端に反復配列（以下、本明細書では「トランスポゾン配列」という）を有し、これがトランスポザラーゼの認識部位である。そ

のような反復配列の例としては、たとえば、配列番号 22～26 の配列を挙げることができるがそれらに限定されない。該トランスポゾン配列は、トランスポザーゼの作用により転移可能であれば、不完全な繰り返し部分を含み得るトランスポゾンが挿入される DNA 中の、トランスポゾンに特有な長さの挿入認

- 5 識サイトは標的配列と呼ばれる。例えば *Sleeping Beauty* (SB) トランスポゾンシステム (Z. Ivics, et al. Cell 91: 501-510 (1997)) の場合、標的配列は TA であり、トランスポゾン挿入後の配列は TA-トランスポゾン-TA である。従って、本明細書では、トランスポゾン配列とは、トランスポザーゼにより認識され、目的となる生物
10 において転移可能な天然または人工トランスポゾンの任意の配列を包含する。

トランスポゾンの標的配列としては、例えば TA、ATAT, TATAT A、TACA などが知られている。標的配列に関わらずトランスポゾンによる遺伝子導入の効率を上げるという課題は、本発明においてトランスポゾンをメチル化することによって達成された。

- 15 トランスポゾンには、主に自らの転移を触媒できる活性な酵素トランスポザーゼを内部にコードしている自己完結型と、トランスポザーゼ活性を欠損した非自己完結型とがある。トランスポゾン配列またはトランスポザーゼ遺伝子を各々有する生物を交配させて、トランスポゾン配列およびトランスポザーゼ遺伝子を有する生物を得る場合、あるいは、転移が固定されたトランスポゾン配
20 列を有する (トランスポザーゼ遺伝子を含まない) 生物を得る場合、非自己完結型のトランスポゾンを用いる。トランスポゾンおよびトランスポザーゼを両方含む生物またはシグニチャー部位 (を含みトランスポゾンおよびトランスポザーゼ遺伝子を含まない生物を得る場合、自己完結型、非自己完結型の両方のトランスポゾンが利用できる。自己完結型トランスポゾンは、後述する Cre
25 loxP システムを用いて、即ち loxP 配列をトランスポザーゼ遺伝子の両側に有する生物と Cre を有する非生物を交配することによりトランスポザー

ぜを切り出すことで、非自己完結型に変換することができる。さらに、トランスポゾンには宿主依存型のものと宿主非依存型のものがあり、これらをいずれも使い得る。一般的には宿主非依存型のものを用い得る。

本発明においては、トランスポゾンおよびトランスポザース遺伝子を含むトランスポゾンシステムよりトランスポゾンのみおよび／またはトランスポザースのみを切り出して用いるか、またはトランスポザースを不活性化させて、トランスポゾンを非自己完結型として用い得る。本発明の実施に有用なトランスポゾンシステムは、生物細胞で転移可能な任意の配列を包含するものであり、好ましくは、*mariner* スーパーファミリーのメンバーを用い得る。例として、*Tc1*、*SB*、*Minos*、*Txr*、*Tc3* 等のトランスポゾンファミリー、*Caenorhabditis elegans*、*Mos1*、*Hyalophora cecropia* 等の *mariner* トランスポゾンファミリー、*Pogo*、*Tigger*、*4* 等の *Pogo* トランスポゾンファミリーが挙げられる (RH Plasterk et al.; Trends in genetics, 15: No. 8: 326-332 (1999))。最も好ましくは、*SB* (*Sleeping Beauty*)。トランスポゾンを用い得る。非自己完結型トランスポゾンは、自己完結型トランスポゾンのトランスポザース遺伝子を除去または不活性化することにより得ることができる。

本明細書において「DNA型」トランスポゾンとは、DNAの転移を行うトランスポゾンをいう。通常のトランスポゾンは、DNA型である。代表的な実施形態では、本発明は、DNA型トランスポゾンを利用して実施される。

本明細書において、「*Tc1*/*mariner* 型トランスポゾン」とは、*Tc1*/*mariner* に類似したトランスポゾンをいう。*Tc1*/*mariner* 型に属するトランスポゾンとしては、例えば、*Minos*、*SB*、*Tc1*、*mariner* などが挙げられるがそれに限定されない。このスーパーファミリーは、脊椎動物ゲノムが起源であるといわれている (Radiceら、19

94; Smit and Riggs, 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1443-1448)。

本明細書において、「SB」または「Sleeping Beauty」とは、
Tc1/mariner型トランスポゾンであって、哺乳動物またはその細胞
5 においてトランスポゾン活性を有するものをいう (Ivics et al.,
Cell 91: 501-510, 1997) をいう。本明細書ではまた、このSBは、SBポリペプチド、SBトランスポゾンなどという。

トランスポゾン配列に挟まれる部分には、様々なDNA配列 (例えば、マーカー遺伝子、遺伝子発現調節配列、所望の遺伝子など) を挿入することができ、
10 トランスポゾン配列の他に必要に応じて種々の構成要素を組み合わせたトランスポゾン構築物を構築することができる。本発明において、トランスポゾン構築物またはトランスポザーゼ遺伝子を導入する対象となる細胞は、生物 (好ましくは非ヒト生物) の個体に分化し得るポテンシャルをもつ細胞であればよく、そのような細胞としては例えば幹細胞または受精卵がある。

15 本発明のトランスジェニック生物には、トランスポゾン構築物およびトランスポザーゼの一方または両方を含む founder (第1世代だけでなく、この founder を基に確立されるトランスジェニック生物の系統も当然に本発明に包含される。さらに、本発明のトランスジェニック生物系統由来の臓器 (器官)、組織、卵、精子、および受精卵、トランスジェニック生物の系統から
20 確立される株化細胞、トランスジェニック生物の系統から作出される生物クローン個体もまた本発明の範囲に含まれる。本発明のトランスポゾン構築物は、トランスポゾン配列の他に種々の構成要素を組み合わせて構築され、幹細胞または受精卵等に導入することができる。

25 以下に本発明者らが行ったトランスポゾンシステムの開発を説明する。
遺伝子破壊効率の高いトランスポゾンベクターの開発：本明細書において使

用されるトランスポゾンシステムは、通常、ゲノム上を移動するDNA 配列であるトランスポゾン配列と、転移を触媒する要素であるトランスポゼースの2つの要素からなる。転移先に遺伝子が存在すると、その遺伝子機能を破壊する可能性があるが、遺伝子の大部分はイントロンであることから、たとえ遺伝子内へ挿入しても、スプライシングの際に容易にトランスポゾン配列が排除されてしまう可能性がある。これを防ぐために内部にスプライスアクセプターを有するような構造を構築することができる。内在性遺伝子の転写産物がトランスポゾン内で止まり、その結果、内在性遺伝子の機能が率に破壊されると期待される。この仮説を検証するために、遺伝子内部にトランスポゾンが挿入した3系統のマウスについてホモ接合体のマウスを得、テールのRNAを用いて、挿入部位上流および下流のエキソンに対応するプライマーによってRT-PCRを行って、正常遺伝子産物に対応するバンドの消失を確認することができる。さらに、期待したスプライシングができたことをlacZ 遺伝子などの発現により確認することができる。このようにして、作製したベクターの遺伝子破壊効率が極めて高いことを証明することができる。さらに、転移の分布を200以上の転移位を決定して調べたところ、約8割の転移は転移前と同一の染色体上に、残りの2割が他の染色体へ起きることも確認することができる。よって、ゲノム全体に対して網羅的に変異を導入するには、種々の染色体上にトランスポゾンを有したマウスを作製することが望ましい。この考えのもとに、現在までに、ゲノム上の異なる部位にトランスポゾンを有するマウスを多数系統確立することができ、実際に本発明者らは20系統以上している。本手法においては、転移前のトランスポゾン挿入部位自体が表現型に影響しないことが重要なので、この条件を満たす系統を同定中である。一方、転移が同一染色体に起きる場合、転移前の3 Mb 以内の距離に集中するようである。このことは、トランスポゾンが、特定の遺伝子座に種々の異なる変異を導入できる可能性を示唆する。実際、ある系統のマウスにおいては、Neurexin 3 遺伝子内へのトランスポゾ

ンの挿入を4匹のマウスにおいて同定した。Neurexin3遺伝子からは、異なるプロモーターによって α 型および β 型の2種類のタンパク質が産生されるが、上記4匹中2匹は α 型のみに、残りの2匹は α 型および β 型両方に変異を導入する位置に挿入を認めることも本発明者らは見出した。このような部位

5 特異的な遺伝子変異導入は、トランスポゾン特有の性質と考えられ、今後の応用が期待できる。

本発明において、トランスポゾンをインビトロでメチル化し、トランスポゼース発現ベクターとともにES細胞へ導入したところ、ゲノムへの転移効率が著しく上昇した。さらに、ゲノム上での転移効率を検定するために、ゲノムの
10 特定の部位へ、メチル化またはメチル化状態のトランスポゾンを挿入した。トランスポゾンのメチル化およびメチル化状態が、ゲノムへの挿入後も維持されていることを確認したのち、細胞内でトランスポゼースを発現させたところ、メチル化導入時の方が、転移反応が百倍以上高かった。トランスポゾン領域がヘテロクロマチン化されていることも明らかとなり、トランスポゾン領域のゲ
15 ノムの状態を修飾することで転移頻度が高められる可能性が示された。

本明細書において「メチル化」とは、核酸分子にメチル基を付加することをいう。同様の効果があれば、メチル基は類似の基（例えば、低級アルキル基）などであってもよい。メチル化は、生体内ではメチル化酵素（メチラーゼ）に
20 よって触媒される。ここでは、メチル基は、メチル基転移反応によって基質から提供される。

1つの例示として、メチル基は5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸の酵素的還元により5-メチルテトラヒドロ葉酸として生成し、ホモシステインに一種のコバミド酵素の作用で転移しメチオニンが作られる。メチオニンはATP
25 の作用によりS-アデノシルメチオニンになり、これがメチル供与体として種々のメチル化合物の生成に用いられる。コリンの酸化された形であるベタイ

ンなどもメチル供与体として働くことがある。各化合物に特異的なメチル基転移酵素が数十種明らかにされており、必要に応じて、適切なものを当業者は選択することができ、本発明において使用することができる。あるいは、メチル化は、酵素を用いるほかに、化学反応によって付加されてもよい。

- 5 本明細書においてメチル化の確認は、当該分野において公知の任意の技術を用いて行うことができる。そのような方法としては、例えば、メチル化による物理的挙動の変動の確認、重亜硫酸改変配列決定 (Bisulfite modified sequence) (Gitman RS, et al., Genome Res. Jan; 12: 158-64, 2002; Lilischkis R, et al. Diagn Mol Pathol. 2000; 9: 165-71.) が挙げられるがそれらに限定されない。

- SBのようなトランスポゾンを用いたシステムは、代表的に、各々の逆方向反復は少なくとも1の同方向反復を含む。本発明のこの態様の遺伝子転移システムは、それゆえ、2つの構成物：トランスポザラーゼおよびクローン化された非
15 自律性（即ち非自己挿入性）サケ科型因子またはトランスポゾン基質DNAの逆方向反復を有するトランスポゾンを含む。一緒にした場合、これら2つの構成物は活性なトランスポゾン活性を供する。

- 本明細書において、「逆方向反復配列」(inverted repetitive sequence) は、トランスポゾンにおいて作動する配列であつて、構造上の特徴としては、両末端の15～40塩基対が逆方向に繰返しのあ
20 る配列があること（例えば、配列番号22～26）が多い。本発明において使用される代表的な配列は、配列番号20および21に示される。この逆方向反復配列は、挿入配列であり、転移因子のひとつである。各逆方向反復配列は好ましくは少なくとも1つの直列反復配列を含む（それ故、IR/DRと称される）。トランスポゾン要素は直鎖状フラグメントとして利用できる直鎖状核酸フ
25 ラグメント（便宜上、5'末端から3'末端に至る）、または例えばプラスミド

の中で環状のものであってよい。好適な態様において、各逆方向反復配列の中には2つの直列反復配列がある。

本明細書において好ましい逆方向反復配列としては、例えば、T c l / m a r i n e r 型トランスポゾン、S B トランスポゾンの逆方向反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。これらの中で、S B に結合するものは、S B トランスポゾンの逆方向反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において好ましい直列反復配列としては、例えば、T c l / m a r i n e r 型トランスポゾン、S B トランスポゾンの直列反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。これらの中で、S B に結合するものは、S B トランスポゾンの直列反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。

同方向反復は、代表的に、約25～約35塩基対の長さ、好ましくは約29～31塩基対の長さである。しかしながら、これにかかわらず、逆方向反復は、唯一の同方向反復を含み得る。この場合、それは実際には反復でないが、以下により詳しく記載するように、共通の同方向配列に対して少くとも約80%の同一性を有するヌクレオチド配列である。トランスポゾン因子は、直鎖フラグメントまたは環状フラグメントとして、例えばプラスミドにおいて用いることができる（慣用的に、5' 末端から3' 末端に広がる）直鎖核酸フラグメントである。

トランスポゾンの好ましい実施形態において、各々の逆方向反復配列に2つの同方向反復がある。（この実施形態において4つになる）同方向反復は、類似したヌクレオチド配列を有し得る。この実施形態の核酸フラグメントの5' 側での逆方向反復は、代表的に、同方向反復（即ち左外側の反復）、介在領域、および第2の同方向反復（即ち左内側反復）を含む。この実施形態の核酸フラグメントの3' 側での逆方向反復は、同方向反復（即ち右内部反復）、介在領域、および第2の同方向反復（即ち右外側反復）を含む。

それらは核酸フラグメント上で互いに対して逆に向いているので、核酸フラ

グメントの5' 逆方向反復内の同方向反復は、核酸フラグメントの3' 逆方向反復内の同方向反復と比べて逆方向にある。逆方向反復内の介在領域は、一般に、少くとも約150塩基対の長さ、好ましくは少なくとも約160塩基対の長さである。その介在領域は、好ましくは約200塩基対以下の長さ、より好ましくは約180塩基対以下の長さである。1つの逆方向反復の介在領域のヌクレオチド配列は別の逆方向反復中の介在領域のヌクレオチド配列と同様であってもそうでなくてもよい。

本明細書において使用され得るほとんどのトランスポゾンには完全な逆方向反復を有するが、SBタンパク質に結合する逆方向反復は、共通同方向反復と少くとも約80%の同一性、好ましくは共通同方向反復と約90%の同一性を有する。好ましい共通同方向反復は、SBトランスポゾンの配列のような配列が挙げられるがそれらに限定されない。

SBタンパク質のコア結合部位と仮定される部位は、配列番号3のN末端から123アミノ酸に存在する。ヌクレオチド同一性は、同方向反復と配列番号1などに記載される配列との間の相同性を行うことにより決定される。

SBタンパク質に結合する同方向反復配列の例としては、SBトランスポゾンの配列が挙げられるがそれらに限定されない。また、左外側反復の例としては、g t t g a a g t c g g a a g t t t a c a c t t a g g (配列番号27)が挙げられるがそれらに限定されない。左内側反復としては、c c a g t g g g t c a g g a a g t t t a c a t a c a c t a a g (配列番号28)が挙げられるがそれらに限定されない。右内側反復としては、左内側反復と類似する配列（例えば、90%以上の同一性）が挙げられるがそれらに限定されない。右外側反復としては、左外側反復配列と類似する配列（例えば90%以上の同一性）が挙げられるがそれらに限定されない。

逆方向反復は、ポリ(A)シグナルAATAAAを含んでいてもよい。このポリ(A)シグナルは、核酸フラグメント中に存在するコーディング配列によ

り利用され得、ポリ（A）テールをmRNAに付加する。ポリ（A）テールのmRNAへの付加は、典型的には、ポリ（A）テールのない同じmRNAと比べてmRNAの安定性を増加させる。好ましくは、逆方向反復は、各々の逆方向反復配列中に2つの同方向反復を含む核酸フラグメントの3'側に存在する。

- 5 逆方向反復は、細胞内のDNAに挿入された核酸配列に隣接するようになる。核酸配列は、遺伝子のオープンリーディングフレームの全部または一部（即ちタンパク質をコードする遺伝子の部分）、単独でまたはオープンリーディングフレームの全部もしくは一部を伴う1または複数の発現調節配列（即ち核酸中の調節配列）を含み得る。好ましい発現調節配列には、これらに限らないが、プロモーター、エンハンサー、ボーダー調節因子、遺伝子座調節領域またはサイレンサーを含む。好ましい実施形態において核酸配列は、オープンリーディングフレームの少なくとも一部に作用可能に連結されたプロモーターを含む。
- 10

- トランスポゾン（トランスポザーゼ）の存在下でDNA上の第一の位置から第二の位置へと移動できる（これを可動性ともいう）。任意の可動カッターアンドペースト型トランスポゾンには2つの基本的な成分であり、それは活性トランスポザーゼの起源と、トランスポザーゼにより認識され、かつ、移動するDNA配列である。DNA配列の移動は認識されたDNA配列の間の介在核酸も移動することを可能にする。
- 15

- 本明細書において「外来遺伝子」とは、本発明の遺伝子転移によって導入されることが意図される遺伝子またはそれをコードする核酸分子をいう。そのような外来遺伝子は、導入が意図される宿主とは異なる起源のものであっても、その宿主由来であってもよい。また、導入が意図される限り、その外来遺伝子をコードする核酸配列は、どのようなタンパク質をコードするものであってもよい。そのような核酸配列によりコードされるタンパク質はマーカータンパク質、例えばグリーン蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、成長ホルモン（例えば遺伝子導入動物の成長を
- 20
- 25

促進するもの) β -ガラクトシダーゼ (lacZ)、ルシフェラーゼ (LUC)、およびインスリン様増殖因子 (IGF) などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、この外来遺伝子は、タンパク質をコードしないものであってもよい。

- 5 トランスジェニック生物の一の実施形態において、タンパク質は細胞からの単離のための生成物である。バイオリクターとしてのトランスジェニック生物公知である。タンパク質は、例えば、乳、尿、血液、体液、果実または卵の中で大量に生産され得る。乳、尿、血液、体液、果実または卵の中での発現を促進するプロモーターが知られている。そのようなものとしては、カゼインプロモーター、マウス尿性タンパク質プロモーター、 β -グロビンプロモーター
- 10 およびオボアルブミンプロモーターが挙げられるがそれらに限定されない。組換えタンパク質が細胞内でタンパク質を製造するためのその他の方法を利用して製造されており、本発明は、そのような組み換えタンパク質を製造する工場を生産するツールまたは技術として使用することができる。これらまたはその他の
- 15 タンパク質をコードする核酸を本発明の核酸フラグメントの中に組み込み、そして細胞に導入することができる。細胞のDNAの核酸フラグメントの効率的な組み込みは本発明の組成物が存在するときに起きる。細胞が遺伝子導入動物の組織または器官の一部であるとき、大量の組換えタンパク質が得られ得る。

(細胞・生物学)

- 20 本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、本発明の核酸分子を導入することができる限り、どのような由来であっても使用すること
- 25 ができ、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞 (例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞) であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、

単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、形質転換またはトランスフェクションが容易な細胞が使用される。本発明において使用される細胞は、核酸分子を導入することが容易な細胞であることが好ましい。

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞（たとえば、任意の種類の単細胞生物（例えば、細菌、酵母）または多細胞生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物）、植物（たとえば、単子葉植物、双子葉植物など）など）でもよい。例えば、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）由来の細胞が用いられ、より詳細には、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）由来の細胞が用いられる。

1つの実施形態では、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞、特にヒト由来の細胞が用いられるがそれに限定されない。本発明において用いられる細胞は、上記細胞は、幹細胞であってもよく体細胞であってもよい。また、そのような細胞は、付着細胞、浮遊細胞、組織形成細胞およびそれらの混合物などであり得る。

本発明において、臓器が対象とされる場合、そのような臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、

本発明が対象とする臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、脾臓、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。植物の場合は、「器官」は、カルス、根、茎、幹、葉、花、種子、胚芽、胚、果実、胚乳などが挙げられるがそれらに限定されない。

- 5 本明細書において「組織」(tissue)とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および／または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および／または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。本発明では、組織を用いてセンサまたはチップを構成することもできる。
- 10
- 15

- 本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）(「pluripotency」)を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹(ES)細胞または組織幹細胞(組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう)であり得るがそれらに限定されない。従って、
- 20
- 本発明では、幹細胞の使用を直接使用することができる。

- 本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。
- 25

本明細書において「単離された」とは、通常環境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないをいう。

従って、単離された細胞とは、天然環境において付随する他の物質（たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸など）を実質的に含まない細胞をいう。核酸

5 またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。単離された核酸は、好ましくは、その核酸が由来する生物において天然に該核酸に隣接している（f l a n k i
10 n g）配列（即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質（例えば、多分化能）を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を
15 維持する。本発明では、安定した結果を提供することができることから、このような樹立された細胞を用いることが好ましい。

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、腓
20 実質細胞、腓管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

本明細書において「生物体」は、生命体として存在し得る1個の個体として存在し得る生物の一形態をいう。従って、植物の場合は、例えば、種子なども
25 含まれ得る。

（生化学・分子生物学）

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、例えば、トランスポザーゼ遺伝子というときは、通常、トランスポザーゼの構造遺伝子およびトランスポザーゼのプロモーターの両方を包含するが、本発明の目的を達成することができる限り、トランスポザーゼの構造遺伝子のみをさしてもよい。本明細書において通常、遺伝子とは、調節領域、コード領域、エキソン、イントロンを含む。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。したがって、通常、本明細書において、遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含し、またその長さは何ら制限されるものではない。従って、本発明の遺伝子には、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA、およびcDNAを含む1本鎖DNA（センス鎖）、ならびにそのセンス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（アンチセンス鎖）、およびそれらのフラグメントのいずれもが含まれる。

本明細書において配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核

酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、
5 96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

本明細書では、特に言及しない限り、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAにおいてデフォルトパラメータを用いて算出される。あるいは、同一性の検索は例えば、
15 NCBIのBLAST 2.2.9（2004.5.12発行）を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメーターの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。

20 本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語は
25 また、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。

そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）を包含する。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。タンパク質の遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとるが、同様の機能を有する限り、ポリペプチドの改変体であってもよい。特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、そのフラグメント、同族体、誘導体、改変体を含む。

- 10 本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド

中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzera, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。タンパク質などの遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に受け入れられた1文字コードにより言及され得る。

その文字コードは以下のとおりである。

アミノ酸

3文字記号	1文字記号	意味
Ala	A	アラニン
Cys	C	システイン
Asp	D	アスパラギン酸
Glu	E	グルタミン酸

	P h e	F	フェニルアラニン
	G l y	G	グリシン
	H i s	H	ヒスチジン
	I l e	I	イソロイシン
5	L y s	K	リジン
	L e u	L	ロイシン
	M e t	M	メチオニン
	A s n	N	アスパラギン
	P r o	P	プロリン
10	G l n	Q	グルタミン
	A r g	R	アルギニン
	S e r	S	セリン
	T h r	T	トレオニン
	V a l	V	バリン
15	T r p	W	トリプトファン
	T y r	Y	チロシン
	A s x		アスパラギンまたはアスパラギン酸
	G l x		グルタミンまたはグルタミン酸
	X a a		不明または他のアミノ酸。

20 塩基

記号 意味

	a	アデニン
	g	グアニン
	c	シトシン
25	t	チミン
	u	ウラシル

- r グアニンまたはアデニンプリン
y チミン／ウラシルまたはシトシンピリミジン
m アデニンまたはシトシンアミノ基
k グアニンまたはチミン／ウラシルケト基
5 s グアニンまたはシトシン
w アデニンまたはチミン／ウラシル
b グアニンまたはシトシンまたはチミン／ウラシル
d アデニンまたはグアニンまたはチミン／ウラシル
h アデニンまたはシトシンまたはチミン／ウラシル
10 v アデニンまたはグアニンまたはシトシン
n アデニンまたはグアニンまたはシトシンまたはチミン／ウラシル、不明、
 または他の塩基。

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性
の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータ
15 を用いて算出される。

本明細書において「ヌクレオチド」は、糖部分がリン酸エステルになっている
ヌクレオシドをいい、DNA、RNAなどを含み、天然のものでも非天然の
ものでもよい。ここで、ヌクレオシドは、塩基と糖とがN-グリコシド結合を
した化合物をいう。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」と
20 は、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機
能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドア
ナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよ
びヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデ
ート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボ
25 ヌクレオチド、ペプチド-核酸（PNA）が含まれるが、これらに限定されな
い。DNAは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAを含む。

1つの実施形態において、改変体は、天然に存在する対立遺伝子変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加、および／または挿入がなされた変異体；コードされるポリペプチドの機能を実質的に変更しないポリヌクレオチド配列を意味し得る。

- 5 1つの実施形態において、これらアミノ酸配列の改変（変異等）は、天然において、例えば変異、翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）を利用して人為的にこれを行なうこともできる。

- 10 1つの実施形態において、上記ポリペプチドは、対立遺伝子変異体、ホモログ、天然の変異体で少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを含む。

- 15 本明細書において、「対応する」アミノ酸または核酸とは、それぞれあるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、あるいは有することが予測されるアミノ酸または核酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、あるトランスポゾン配列であれば、そのトランスポゾン配列の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

- 20 本明細書において、「対応する」遺伝子（例えば、核酸分子、ポリペプチドなど）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログあるいは種相同体であり得る。したがって、マウストランスポゾン、マウストランスポザーゼなどに対応する遺伝子は、他の動物においても見出すことができる。
- 25 そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定する

ことができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、マウストランスポゾン、マウストランスポザーゼなど）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばヒト、ラット、イヌ、ネコ）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。このような対応する遺伝子は、ゲノムデータベースを利用すれば、当業者は容易に得ることができる。そのようなゲノム配列の入手方法は、当該分野において周知であり、本明細書において他の場所に記載される。本発明では、このような検索によって得られた配列も利用可能である。

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能（例えば、マウストランスポゾン、マウストランスポザーゼなどの機能）を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないこ

とが理解されるべきである。本発明では、マウストランスポゾン、マウストラ
ンスポザーゼなどとして機能する、すなわち、転移活性を有する限り、どのよ
うなフラグメントであっても使用可能であることが理解される。

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子を
5 いう。

本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌
類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。従って、本明細書では生体
分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影
響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。したがって、コンビナトリ
10 アルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（たと
えば、低分子リガンドなど）もまた生体への効果が意図され得るかぎり、生体分
子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリ
ゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチ
ド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのよう
15 なRNAを含む）、ポリサッカライド、オリゴサッカライド、脂質、低分子（例
えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子など）、これらの複合分
子（糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質など）などが包含されるがそれら
に限定されない。生体分子にはまた、細胞への導入が企図される限り、細胞自
体、組織の一部も包含され得る。通常、生体分子は、核酸、タンパク質、脂質、
20 糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカ
ンなどであり得る。好ましくは、生体分子は、核酸（DNAまたはRNA）ま
たはタンパク質を含む。別の好ましい実施形態では、生体分子は、核酸（例
えば、ゲノムDNAまたはcDNA、あるいはPCRなどによって合成されたD
NA）である。他の好ましい実施形態では、生体分子はタンパク質であり得る。
25 好ましくは、そのような生体分子は、ホルモンまたはサイトカインであり得る。

本明細書において「化学合成物」とは、通常の化学技術を用いて合成され得

るすべての物質をいう。従って、化学合成物は、化学物質の範囲内にある。実質的には化学物質は、ほぼすべて合成することができる。そのような合成技術は、当該分野において周知であり、当業者は、適宜そのような技術を組み合わせて化学合成物を製造することができる。

- 5 本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転移活性）を発揮する活性が包含される。ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それによる発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドまたはレセプターである場合、そのリガンドまたはレセプターがそれぞれ対応するレセプターまたはリガンドへの結合が生物学的活性に包含される。その生物学的活性が転写調節活性である場合は、転写レベルまたはその変動を調節する活性をいう。例えば、ある因子がトランスポゾンであるとき、その生物学的活性は転移活性である。転移活性を測定する例は、例えば、実施例に記載されるような技術が挙げられ、そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって決定することができる。
- 10
- 15

- 本明細書において、「ストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC
- 20
- 25

溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムである)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチ

ド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)) などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ (マイクロアレイアッセイ)、PCRおよび in situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、このような検索によって同定されたトランスポゾン、トランスポザーゼ、トランスポゾン配列などもまた、使用され得る。

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において

高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、65~68℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N, Y. 1989); およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach、IV、IRL Press Limited (Oxford, England), Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤）を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO_4 またはSDS)、Ficoll、Denhardt溶液、超音波処理されたサケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイ

ゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8～7.4で実施されるが；代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%G+C) - 600/N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の（グアニン+シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致（ミスマッチ）に対して約1℃ずつ減少する。

本明細書において「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、50～65℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37～50℃である。例として、0.015M ナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリン

ジェントな」条件は、約 21% の不一致を許容する。

本明細書において「高度」にストリンジェントな条件と「中程度」にストリンジェントな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015M ナトリウムイオン（ホルム
5 アミドなし）において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約 71℃である。65℃（同じイオン強度）での洗浄において、これは、約 6% 不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

約 20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaCl
10 a Clにおける融解温度の適切な概算は、
$$T_m = (1 \text{ つの A-T 塩基につき } 2^\circ\text{C}) + (1 \text{ つの G-C 塩基対につき } 4^\circ\text{C})$$
によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである（Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683
15 頁、BrownおよびFox（編）（1981）を参照のこと）。

トランスポゾン、トランスポザーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどのタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号 1、2、10、12、14、16、18などの核酸配列の一部またはその改変体を含むPCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有するcDNAライブラ
20 リーから容易に分離される。好ましいトランスポザーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン（BSA）；500mM リン酸ナトリウム（NaPO₄）；1mM EDTA；42℃の温度で 7% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に2×SSC（600mM NaCl；60mM クエン酸ナトリウム）；50℃の0.1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリン
25 ジェント条件下、さらに好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清

アルブミン (BSA); 500 mM リン酸ナトリウム (NaPO_4); 15%ホルムアミド; 1 mM EDTA; 7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に 50°C の 1×SSC (300 mM NaCl; 30 mM クエン酸ナトリウム); 1% SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、最も好ましくは本質的に 50°C の温度での 1%ウシ血清アルブミン (BSA); 200 mM リン酸ナトリウム (NaPO_4); 15%ホルムアミド; 1 mM EDTA; 7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に 65°C の 0.5×SSC (150 mM NaCl; 15 mM クエン酸ナトリウム); 0.1% SDS を含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号 1、2、10、12、14、16、18 などに示される核酸配列の 1 つまたはその一部とハイブリダイズし得る。

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび/またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも 11 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 12 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 13 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 14 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 25 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 30 の連続するヌクレオチド長の、少なくとも 40 の連続するヌクレオチド長の、少なく

とも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。このようなプローブを用いて本発明において使用され得るトランスポゾンを得ることができる。

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、DNAまたはRNAなど）が用いられ得る。

遺伝子工学分野において通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌクレオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。

る。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTar）を用いて行ってもよい。このようなプライマーを用いて本発明に用いるトランスポゾンを作製することができる。

- 5 本明細書において、「エピトープ」とは、抗原決定基を意味する。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体（MHC）レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが包含される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたは
- 10 インビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に
- 15 3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的
- 20 コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81:3998 (1984) (所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法)；米国特許第4,708,871号（抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するため
- 25

の手順)；およびGeysenらMolecular Immunology
23：709（1986）（所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを
同定するための技術）を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単
純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピ
5 トープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープ
は、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知
慣用技術を用いて決定することができる。

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3
アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4
10 アミノ酸、より好ましくは5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、
9アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸の長
さの配列が必要であり得る。エピトープは、市販のキット（例えば、Pe p S
e tTM（クラボウ））を用いて当業者が容易に決定することができる。本発明で
は、あるシグナル伝達において役割を果たすタンパク質のエピトープを提示す
15 ることによって、シグナル伝達を測定する系を利用してもよい。

本明細書においてある核酸分子またはポリペプチドに「特異的に結合する因
子」とは、その核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルが、
その核酸分子またはポリペプチド以外の核酸分子またはポリペプチドに対する
その因子の結合レベルと同じかまたはそれよりも高い因子をいう。そのような
20 因子としては、例えば、対象が核酸分子の場合、対象となる核酸分子に対して
相補的な配列を有する核酸分子、対象となる核酸配列に対して結合するポリペ
プチド（例えば、転写因子など）などが挙げられ、対象がポリペプチドの場合、
抗体、単鎖抗体、レセプターーリガンドの対のいずれか一方、酵素ー基質のい
ずれか一方などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、こ
25 のような特異的に結合する因子（例えば、カルシウムに特異的に結合する因子、
特定の遺伝子産物に対する抗体など）は、シグナル伝達を測定する際に利用さ

れ得る。

(ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの改変)

本発明では、トランスポゾン、トランスポザーゼなどの機能的ポリペプチドを使用する場合、同様の機能（転移活性など）が達成することができる限り、

- 5 その改変体（本明細書において機能的改変体ともいう）を使用してもよい。

ここで、あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

- 15 上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている（K y t e, J および D o o l l i t t l e, R. F. J. M o l. B i o l. 1 5 7 (1): 1 0 5 - 1 3 2, 1 9 8 2)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、
- 20 次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン（+4. 5）；バリン（+4. 2）；ロイシン（+3. 8）；フェニルアラニン（+2. 8）；システイン／シスチン（+2. 5）；メチオニン（+1. 9）；アラニン（+1. 8）；グリシン（-0. 4）；スレオニン（-0. 7）；セリン（-0. 8）；トリプトファン（-0. 9）；チロシン（-1. 3）；プロリン（-1.
- 25

6)；ヒスチジン（−3.2）；グルタミン酸（−3.5）；グルタミン（−3.5）；アスパラギン酸（−3.5）；アスパラギン（−3.5）；リジン（−3.9）；およびアルギニン（−4.5）である。

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、
5 そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが
10 当該分野において理解される。

また、本発明において用いられるタンパク質の改変を考慮する場合、親水性指数も考慮され得る。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（−0.4）；プロリン（−0.5±1）；アラニン（−0.5）；ヒスチジン（−0.5）；システイン（−1.0）；メチオニン（−1.3）；バリン（−1.5）；ロイシン（−1.8）；イソロイシン（−1.8）；チロシン（−2.3）；フェニルアラニン（−2.5）；およびトリプトファン（−3.4）。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

25 例えば、下記のRNAコドン（それ故、対応のDNAコドンではTがUに置き代わる）が各特定のアミノ酸をコードするのに交換可能に利用できることが

当業界において周知である：フェニルアラニン（P h eまたはF）UUUまたはUUCロイシン（L e uまたはL）UUA，UUG，CUU，CUC，CUAまたはCUGイソロイシン（I l eまたはI）AUU，AUCまたはAUAメチオニン（M e tまたはM）AUGバリン（V a lまたはV）GUU，GUC，GUA，GUGセリン（S e rまたはS）UCU，UCC，UCA，UCG，AGU，AGCプロリン（P r oまたはP）CCU，CCC，CCA，CCGスレオニン（T h rまたはT）ACU，ACC，ACA，ACGアラニン（A l aまたはA）GCU，GCG，GCA，GCCチロシン（T y rまたはY）UAUまたはUACヒスチジン（H i sまたはH）CAUまたはCACグルタミン（G l nまたはQ）CAAまたはCAGアスパラギン（A s nまたはN）AAUまたはAACリジン（L y sまたはK）AAAまたはAAGアスパラギン酸（A s pまたはD）GAUまたはGACグルタミン酸（G l uまたはE）GAAまたはGAGシステイン（C y sまたはC）UGUまたはUGCアルギニン（A r gまたはR）CGU，CGC，CGA，CGG，AGA，AGCグリシン（G l yまたはG）GGUまたはGGCまたはGGAまたはGGG終止コドン UAA，UAGまたはUGA さらに、特定のDNA配列を修飾して特定の細胞タイプは好適なコドンを採用することができる。例えば、E. c o l i のための好適なコドン用法は、動物およびヒトにとっての好適なコドン用法と同じように公知である。このような変更は当業者に周知であり、本発明の一部を構成する。

このようにして作製した改変体もまた、本発明の範囲内にあり、任意のそのような改変体が発明において利用され得る。

（抗原・抗体）

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF（a b'）₂およびF

a bフラグメント、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

- 5 本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにF a b分子、F (a b')₂フラグメント、F vフラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

- モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、K o h l e rおよびM i l s t e i n, N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5)) またはその改変（例えば、B u c kらIn V i t r o 1 8 : 3 7 7 (1 9 8 2))
- 15 を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現するB細胞がプレ
- 20 ートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたB細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させることができる。

- 25 本明細書において「抗原」(a n t i g e n) とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(i m m u n o

gen) とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。したがって、トランスポザーゼまたはその下流の産物は、抗原または免疫原として使用され、抗原抗体反応を利用して本発明のセンサを実現することができる。

5 (遺伝子操作)

本明細書において、「遺伝子カセット」とは、遺伝子をコードするDNAと、これに作動可能に（すなわち、そのDNAの発現を制御し得るように）連結された植物遺伝子プロモーターとを含む核酸配列、ならびに、必要に応じてプロモーターと、これに作動可能に（すなわち、インフレームに）連結された異種
10 遺伝子とを含む核酸配列をいう。このカセットは、必要に応じて他の調節エレメントと組み合わせて使用することもまた、本発明の範囲に含まれる。好ましい発現カセットは、特定の制限酵素で切断され、容易に回収され得る遺伝子カセットである。

本明細書において遺伝子操作について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、
15 酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベ
20 クター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチプルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書
25 に記載される文献（例えば、Sambrookら、前出）に記載されている。

本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節

するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節
5 エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

原核細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNA3 (+)、p B l u e s c r i p t - S K (+/-)、p G E M - T、p E F - B O S、p E G F P、p H A T、p U C 1 8、p F T - D E S T TM 4 2 G A T E W A Y (I n v i t r o g e n) などが例示される。
10

動物細胞に対する組換えベクターとしては、p c D N A I / A m p、p c D N A I、p C D M 8（いずれもフナコシより市販）、p A G E 1 0 7 [特開平3-229 (I n v i t r o g e n)、p A G E 1 0 3 [J. B i o c h e m., 101, 1307 (1987)], p A M o、p A M o A [J. B i o l. C h e m., 268, 22782-22787 (1993)], マウス幹細胞ウイルス (M u r i n e S t e m C e l l V i r u s) (M S C V) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、p E F - B O S、p E G F P などが例示される。
15

植物細胞に対する組換えベクターとしては、p P C V I C E n 4 H P T、p C G N 1 5 4 8、p C G N 1 5 4 9、p B I 2 2 1、p B I 1 2 1 などが挙げられるがそれらに限定されない。
20

本明細書において「ターミネーター」とは、通常遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列をいう。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

25 本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラ

ーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2 k b p以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。代表的には、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2 k b p以内に存在するがそれに限定されない。

- 10 本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

- 15 本明細書において「サイレンサー」とは、遺伝子発現を抑制し静止する機能を有する配列をいう。本発明では、サイレンサーとしてはその機能を有する限り、どのようなものを用いてもよく、サイレンサーを用いなくともよい。

- 20 本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

- 25 本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology

y, Wiley, New York, NY; Sambrook Jら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法が挙げられる。

本明細書において「遺伝子導入試薬」とは、核酸（通常遺伝子をコードするが、それに限定されない）の導入方法において、導入効率を促進するために用いられる試薬をいう。そのような遺伝子導入試薬としては、例えば、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウムなどが挙げられるがそれらに限定されない。トランスフェクションの際に利用される試薬の具体例としては、種々なソースから市販されている試薬が挙げられ、例えば、Effectene Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Pr

omega, WI), TfxTM-20 Reagent (E2391, Prom
ega, WI), SuperFect Transfection Reagent
(301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection
5 Reagent (301105, Qiagen, CA), Lip
fectAMINE 2000 Reagent (11668-019, In
vitrogen corporation, CA), JetPEI (×4) c
onc. (101-30, Polyplus-transfection, Fra
nce) および ExGen 500 (R0511, Fermentas In
c., MD) などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明においては、本
10 発明の核酸分子を細胞に導入する際にこのような遺伝子導入試薬が使用され得
る。

遺伝子導入効率は、単位面積（例えば、1mm²など）あたりの導入外来物質
（導入遺伝子）（例えば、レポーター遺伝子の産物、蛍光タンパク質 GFP など）
の導入（発現）細胞数、または総信号（蛍光タンパク質の場合は、蛍光）量を
15 測定することによって算定することができる。

本明細書において「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞な
どの生命体の全部または一部（組織など）をいう。形質転換体としては、原核
生物、酵母、動物、植物、昆虫などの細胞などの生命体の全部または一部（組
織など）が例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、
20 形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細
胞は、形質転換体であってもよい。

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原
核生物細胞としては、Escherichia 属、Serratia 属、Ba
cillus 属、Brevibacterium 属、Corynebacte
25 rium 属、Microbacterium 属、Pseudomonas 属な
どに属する原核生物細胞、例えば、Escherichia coli XL

1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1が例示される。あるいは、本発明では、天然物から分離した細胞も使用することができる。

本明細書において遺伝子操作などにおいて使用され得る動物細胞としては、

- 5 マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト結腸癌細胞株などを挙げるができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293（ATCC：CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH、SK-N-SH-5Y、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aなどが例示される。あるいは、本発明では、初代培養細胞も使用することができる。
- 10
- 15

本明細書において遺伝子操作などにおいて使用され得る植物細胞としては、カルスまたはその一部および懸濁培養細胞、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科などの植物の細胞が挙げられるがそれらに限定されない。

- 20 本明細書において遺伝子発現（たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現）の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA
- 25

法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet.

5 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析手法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。

25 「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レ

ベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」または「発現量」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、

- 5 発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」または「発現量」の「増加」とは、細胞内に遺伝子発現に関連する因子（例えば、発現されるべき遺伝子またはそれを調節する因子）を導入したときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチド
- 10 の発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。

- 15 本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。
- 20 本発明によって生物に導入される遺伝子は、特異的に発現するように改変されていてもよい。

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、コラーゲン

25 ンがそのリガンドと相互作用する場合、その生物学的活性は、結合体の形成または他の生物学的変化を包含する。別の好ましい実施形態では、そのような生

物学的活性は、遺伝子転移活性などであり得る。遺伝子転移活性は、その目的とする遺伝子をコードする配列の移動を任意の方法によって確認することによって判定され得る。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる (Molecular Cloning, Current Protocols (本明細書において引用) などを参照)。

本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分 (例えば、試薬、粒子、細胞、核酸など) が提供されるユニットをいう。混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分 (例えば、試薬、粒子など) をどのように処理すべきかを記載する説明書を備えていることが有利である。このような説明書は、どのような媒体であってもよく、例えば、そのような媒体としては、紙媒体、伝送媒体、記録媒体などが挙げられるがそれらに限定されない。伝送媒体としては、例えば、インターネット、イントラネット、エクストラネット、LANなどが挙げられるがそれらに限定されない。記録媒体としては、CD-ROM、CD-R、フレキシブルディスク、DVD-ROM、MD、ミニディスク、MO、メモリースティックなどが挙げられるがそれらに限定されない。

(トランスジェニック生物)

トランスジェニックマウスを作製するための一般的な技術は、国際公開WO 01/13150 (Ludwig Inst. Cancer Res.) に記載されている。米国特許第4,873,191号 (Wagner et al.) は、哺乳動物接合体へのDNAのマイクロインジェクションによって得られた、

外因性DNAを有する哺乳動物を教示している。さらに転移性遺伝因子（トランスポゾン）を内因性DNAに挿入あるいはさらに転移させることで、該DNAの構造変化を起こしてこれを不活性化させ、動植物等の変異体を効率的に作出する方法が研究されてきている。トランスポゾンを利用した、染色体への特定遺伝子の導入・付加等が可能となってきた。

このほかにもまた、トランスジェニック生物を作り出すための様々な方法は、例えば、M. Markkulaら、Rev. Reprod., 1, 97-106 (1996); R. T. WallらJ. Dairy Sci., 80, 2213-2224 (1997); J. C. Daltonら、Adv. Exp. Med. Biol., 411, 419-428 (1997); およびH. Lubonら、Transfus. Med. Rev., 10, 131-143 (1996) などが挙げられるがそれらに限定されない。これらの文献の各々は、本明細書において参考として援用される。

そのような中、最近10年間ほどで、遺伝子機能の解析を目的として、胚性幹（ES）細胞の相同組換えを介したトランスジェニック（ノックアウト、ノックインを含む）動物の解析が重要な手段となってきた。

高等生物では、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を用いる陽性選択およびHSVのチミジンキナーゼ遺伝子またはジフテリア毒素遺伝子を用いる陰性選択により組換え体の効率的な選別が行われている。PCRまたはサザンブロット法により相同組換え体の選択が行われる。すなわち、標的遺伝子の一部を陽性選択用のネオマイシン耐性遺伝子等で置換し、その末端に陰性選択用のHSV TK遺伝子等を連結したターゲティングベクターを作成し、エレクトロポレーションによりES細胞に導入し、G418およびガンシクロピルの存在下で選択して、生じたコロニーを単離し、さらにPCRまたはサザンブロットにより相同組換え体を選択する。

このように、内在する標的遺伝子を置換または破壊して、機能が喪失したか

または変更された変異を有するトランスジェニック（標的遺伝子組換え）マウスを作製する方法は、標的とした遺伝子だけに変異が導入されるので、その遺伝子機能の解析に有用である。本発明を使用すれば、さらにメチル化により転移効率が上がることから、遺伝子の解析効率が飛躍的に上昇する。

- 5 所望の相同組換え体を選択した後、得られた組換えE S細胞を胚盤注入法または集合キメラ法により正常な胚と混合してE S細胞と宿主胚とのキメラマウスを作製する。胚盤注入法では、E S細胞を胚盤胞にガラスピペットで注入する。集合キメラ法では、E S細胞の塊と透明帯を除去した8細胞期の胚とを接着させる。E S細胞を導入した胚盤胞を偽妊娠させた代理母の子宮に移植して
- 10 キメラマウスを得る。E S細胞は、全能性を有するので、生体内では、生殖細胞を含め、あらゆる種類の細胞に分化することができる。E S細胞由来の生殖細胞を有するキメラマウスと正常マウスを交配させるとE S細胞の染色体をヘテロに有するマウスが得られ、このマウス同士を交配するとE S細胞の改変染色体をホモに有するトランスジェニックマウスが得られる。得られたキメラマウスから改変染色体をホモに有するトランスジェニックマウスを得るには、雄
- 15 性キメラマウスと雌性野生型マウスとを交配して、F 1世代のヘテロ接合体マウスを産出させ、生まれた雄性および雌性のヘテロ接合体マウスを交配して、F 2世代のホモ接合体マウスを選択する。F 1およびF 2の各世代において所望の遺伝子変異が導入されているか否かは、組換えE S細胞のアッセイと同様に、サザンブロッティング、PCR、塩基配列の解読など当該分野において慣
- 20 用される方法を用いて分析され得る。

しかし、現在行われているトランスジェニック動物の作製技術では、多様な遺伝子機能を選択的に解析することが困難であるという欠点を有する。また容易にトランスジェニック生物を作製できないという欠点も存在する。

- 25 また、現行のトランスジェニック動物の作製は、目的の遺伝子を同定した後、上述のようにその目的の遺伝子を一から置換または破壊および置換するこ

とが必要であり、非常に労力および時間がかかる上、熟練した研究者でも必ずうまくいくとは限らない。従って、未だに労働集約的な作業を要する仕事である。

そのため、多様な遺伝子機能を選択的に解析することができないという問題を克服する次世代技術として、Creレコンビナーゼの細胞種特異的発現とCre-loxPの部位特異的組み換えを併用する技術が注目されている。Cre-loxPを用いるトランスジェニックマウスは、標的遺伝子の発現を阻害しない位置にネオマイシン耐性遺伝子を導入し、後に削除するエクソンをはさむようにしてloxP配列を挿入したターゲティングベクターをES細胞に導入し、その後相同組換え体を単離する。この単離したクローンからキメラマウスを得、遺伝子改変マウスが作製される。次に、大腸菌のP1ファージ由来の部位特異的組換え酵素Creを組織特異的に発現するトランスジェニックマウスとこのマウスを交配させると、Creを発現する組織中でのみ遺伝子が破壊される（ここでは、Creは、loxP配列（34bp）を特異的に認識して、2つのloxP配列にはさまれた配列で組換えを起こさせ、これが破壊される）。臓器特異的なプロモータに連結したCre遺伝子を有するトランスジェニックマウスと交配させるか、またはCre遺伝子を有するウイルスベクターを使用して、成体でCreを発現させることができる。さらに、本発明を使用すれば、さらにメチル化により転移効率が上がることから、遺伝子の解析効率が飛躍的に上昇する。

特定の遺伝子を解析する方法としてジーントラップ（遺伝子トラップ）法が注目されている。ジーントラップ法では、プロモータを有しないレポーター遺伝子が細胞に導入され、その遺伝子が偶発的にゲノム上に挿入されると、レポーター遺伝子が発現することを利用して、新規な遺伝子を単離（トラップ）される。ジーントラップ法は、マウス初期胚操作法、胚性幹細胞培養法、相同組換えによる遺伝子ターゲティング法に基づく、効率的な挿入変異と未知遺伝子

同定のための方法である (Stanford W.L., et al., Nature Genetics 2: 756-768 (2001))。ジーントラップ法では、遺伝子の導入ならびに挿入変異体の選択およびその表現型解析が比較的容易である。

- 5 ジーントラップ法では、例えば、スプライシング/アクセプター配列とポリA付加シグナルとの間に lacZ と neo との融合遺伝子である β -geo を連結したジーントラップベクターを ES 細胞に導入し、G418 で選択すると、ES 細胞で発現している遺伝子を偶然にトラップしたクローンだけが選択される。
- 10 このようにして得られたクローンからキメラ胚を作製すると、トラップした遺伝子の発現パターンにより、さまざまな X-gal の染色パターンを示す。このようにして、ジーントラップ法では、未知の遺伝子が単離され、その遺伝子発現パターンが解析され、またその遺伝子が破壊される。本発明を使用すれば、さらにメチル化により転移効率が上がることから、遺伝子の解析効率が飛
- 15 躍的に上昇する。

- 本発明を用いれば、トランスポザーゼ遺伝子を有するトランスジェニック生物と、非自己完結型トランスポゾン含有トランスジェニック生物とを交配して、
- 「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン含有トランスジェニック生物」を得ることができる。ここでは、非自己完結型トランスポゾンとは、それ自身では転移が不可能なものをいう。自己完結型トランスポゾンとは、それ自身で転移が可能なものをいう。この方法によると、同様の親を交配させることにより、同一遺伝子をもつ仔哺乳動物を新たに得ることができる。この方法によれば、トランスポゾン構築物のみが導入されたことによる哺乳動物における
- 20 表現型に与える影響をあらかじめ知ることができる。同様に、トランスポザーゼ構築物のみが導入されたことによる哺乳動物における表現型に与える影響を
- 25

あらかじめ知ることができる。あるいは、トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾンを含めから導入した、交配によらない「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン含有トランスジェニック生物」を得ることもできる。この方法によれば親同士を交配する必要がないため、手間や時間、コスト面で効率がよい。従って、本発明では、このようなトランスジェニック生物の作製方法を適用することができる。

この「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン含有トランスジェニック生物」において、トランスポゾンは転移可能な状態で含まれるため染色体上の任意の部位に転移可能であり、この転移により染色体上の任意部位の遺伝子機能を破壊、低下ないし活性化することが可能である。

さらに、「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン配列含有トランスジェニック生物」と「トランスポザーゼを含まない生物」を交配して、「トランスポゾンを有するがトランスポザーゼ遺伝子を有しない生物」を得ることができる。トランスポザーゼが 1 o x P で挟まれている場合、 $C r e$ を含む生物と交配してもよい。

好ましい実施形態では、ほぼ全細胞に (i) 少なくとも、1つのトランスポザーゼ遺伝子および少なくとも1つの非自己完結型トランスポゾンあるいは自己完結型トランスポゾン、ならびに (i i) 少なくとも1つのシグニチャー部位を有するトランスジェニック生物」は、「GFPを任意成分として内部に含むトランスポゾン配列 (TP) とトランスポザーゼ遺伝子 (SB) を両方有するトランスジェニック生物 (以下、「TP-SB生物」ということがある)」に対応し、「GFPを任意成分として内部に含むトランスポゾン配列 (TP) を有するがトランスポザーゼ遺伝子 (SB) を有しない生物 (以下、「TP生物」ということがある)」と、「トランスポザーゼ遺伝子 (SB) を有するがトランスポゾン配列を有しない生物 (以下、「SB哺乳動物」ということがある)」を交配して得られるものである。

1つの実施形態において、本発明のこのトランスジェニック生物はトランス
ポゾンあるいはシグニチャー部位を有する動物幹細胞または受精卵から誘導さ
れているので、本質的に全ての細胞においてトランスポザーゼ遺伝子を有する
はずであるが、トランスポゾンが切り出される際にシグニチャー部位を残さず
5 かつ転移しないこともあり得ることから、「ほぼ全細胞」と表現することができる。本明細書では、「ほぼ全細胞」はこのような特別な細胞を除く全細胞を意味
する。上記生物は、その各細胞においてトランスポゾンがランダムに転移して
おり、そのため、トランスポゾンにより導入された遺伝子変異に関して個体全
体として統一的な変異が見いだされないものである。

10 別の実施形態において、本発明のトランスジェニック哺乳動物のうち「TP
-SB哺乳動物」と「トランスポザーゼを含まない生物」を交配して得られる
ものは、「TP-SB哺乳動物」のシグニチャー配列に基づく遺伝子変異が受精
卵の段階で既に存在し、哺乳動物個体のほぼ全細胞で共通のシグニチャー部位
を含むものである。

15 本発明においては、所望のトランスジェニック生物をプレスクリーニングし
得る。プレスクリーニングの方法としては、例えばジーントラップ法を用いる
ことができる (Zambrowicz et al.; Nature, 392:
608-611 (1998); Gossler et al.; Science,
244: 463-465 (1989); Skallnes, WC. et al.;
20 Genes Dev. 6: 903-918 (1992); Friedrich,
G. et al.; Genes Dev. 5: 1513-1523 (1991))。
このように、プレスクリーニングを行うことにより遺伝子機能の解明に有望な
トランスジェニック生物を予め選抜しその後2世代以上の交配あるいはその
他適宜の手段により、1対の染色体の両遺伝子に変異したトランスジェニック
25 生物を得ることができる。

遺伝子破壊してその表現型を解析する手法は、遺伝子機能を解明するための

有効な手段である。哺乳動物個体、特にマウスで網羅的に遺伝子破壊を起こし表現型を解析するためには、克服しなければいけない大きな問題点が二つある。一番目は、網羅的に遺伝子破壊を起こし表現型を目安に遺伝子機能を探る手法、いわゆるフォワードジェネティックスが整備されていないことである。二番目は、遺伝子が一对（両対立遺伝子）あるために片側の遺伝子を破壊しただけでは表現型が現れないことである。両対立遺伝子変異を導入するためには、現在のところ片側の遺伝子が破壊された個体同士の交配に依存している。つまり、両対立遺伝子変異導入個体を得るための交配に長時間をかける必要性がある。

一番目の問題点は、本発明において改良されたトランスポゾンシステムによりよく克服できる。二番目の問題点は、迅速な両対立遺伝子変異導入法により克服できる二番目の問題点を克服するための具体的手段として、両対立遺伝子変異を有する細5胞が高頻度に現れるBloom遺伝子ノックアウトマウスを用いることができる（G. Luo et al.; Nature Genetics, 26: 424-429 (2000)）。但し、完全なBloom遺伝子ノックアウトマウスは致死性であり（N. Chester et al.; Genes and Dev., 12: 3382-3393 (1998)）、二番目の問題点を克服できない可能性がある。そこで、本発明者らは、Bloom遺伝子の発現を自由に調節できうる様なマウスをtetOFFのシステム（CT, Bondet et al.; Science, 289: 1942-1946 (2000)）を用いて作製中である。Bloom遺伝子はDNAヘリカーゼをコードし、その活性が欠損すると、姉妹染色分体交換（sister chromatid exchange = SCE）が起こり、同時に別のchromatidとの交換も起こる。従って、Bloom遺伝子を欠損させると、4倍体の状態で組換えが起こり、一对の遺伝子が両方とも変異した細胞を、個体の一部で生じさせ得る。

例としてBloom遺伝子のON/OFFをテトラサイクリン依存的に行う

ようにしておくと (A. K i s t n e r e t a l. P r o c. N a t l. A c a d. S c i.. U S A, 9 3 : 1 0 9 3 3 - 1 0 9 3 8 (1 9 9 6)) T
ーテトラサイクリンを与えるまたは与えない時期を調節することで、時期特異
5 的により多くの組換えを誘発し、一対の変異遺伝子を有する細胞に導くことが
できる。従って、交配を繰り返すことなく、一対の遺伝子の変異した生物を得
ることができる。時期特異的に変異を導入するには、例えば、ペレットを持続
的に生物母体に経口投与することで、一対の遺伝子の変異した胎児を得ること
ができる。

B l o o m 遺伝子を調節可能に発現させるための一例としてのテトラサイク
10 リンレギュレータブルユニット (T e t r a c y c l i n r e g u l a t a
b l e u n i t) のような手段の導入は、トランスポゾンシステムと組み合
わせて行う。例えば、トランスポゾンコンストラクト、トランスポザーゼ、自
己完結型トランスポゾンなどが導入される受精卵等に予め B l o o m 遺伝子を
調節可能に発現する手段を導入しておいて交配を行う。得られたトランスポ
15 ン転移部位が導入されたマウスに、B l o o m 遺伝子の発現を抑制する手段 (例
えばテトラサイクリンの投与) を実施することで、トランスポゾンシステムに
より得られた遺伝子の変異を両対立遺伝子に導入し、表現型の確認を迅速に行
うことができる。本発明において選択マーカー遺伝子を用いない場合は、該ト
ランスジェニック生物の細胞から DNA を抽出し、サザンプロット法により転
20 移の有無を調べることで、スクリーニングを行ない得る。本発明によれば、動
物体内で、効率のよいトランスポゾン配列の転移を達成することができる。ト
ランスポゾンを用いた変異の導入法によれば、他の方法に比べ、多種多様な表
現型をもつ生物を効率よくかつランダムに得ることが可能となる。本発明のト
ランスジェニック生物は、遺伝子機能研究において、多様な遺伝子変異を導入
25 することにより、複雑な生命現象を解明するためのツールとしてきわめて有用
である。

また、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95: 10769-10773, 1998に記載されるように、細胞におけるトランスポゾンの発現頻度は細胞あたり最大で 3.5×10^{-5} 回/1世代あたりの1細胞と極めて低い。これに対して、本発明による個体でのトランスポゾン発現率は、例えば実施例においては全マウス中42%、GFP遺伝子陽性マウス中最大80%であり、著しく高いという特徴をもつ。このようにトランスポゾン発現システムが動物またはその組織、器官などの細胞集合体となることでトランスポゾンの転移効率が飛躍的に高めることが容易になったのは、本発明において初めて見出された知見である。

- 10 本発明の1実施態様によれば遺伝子機能を鮮明する手段として、ランダムにトランスポゾン構築物を導入したトランスジェニック生物群の中から、マーカ一あるいは他の手段によりランダムに導入された変異を有する個体を見出すことが可能である。遺伝子機能を網羅的に解析するには、トランスポゾンがゲノムのより多くの部位へ転移する必要がある。本発明によれば、「ほぼ全細胞に
- 15 (i) 少なくとも1つのトランスポザーゼ遺伝子および少なくとも1つの非自己完結型トランスポゾンあるいは自己完結型トランスポゾンならびに (ii) 少なくとも1つのシグニチャー部位を有するトランスジェニック生物」を得ることができる。例えばマウスを対象とした以下の実施例などで示され得るのように、細胞10個当たり1個以上の割合でシグニチャー部位を導入することができ、その結果種々雑多な細胞をモザイク状にもつそのような「種マウス」が
- 20 得られ、該マウスは1個体当たり約1万以上の転移部位を有するとの結果を得ている。従って、異なる種マウスから変異マウスを作製することにより、約3万以上あるとされる遺伝子のほぼ全てについて網羅的に変異導入することも可能である。このように、変異を有する生物個体を解析する際、本発明では遺伝子変異の発現頻度が極めて高いので、複数の変異をもつ生物が1個体得られれば、多くの変異の機能変化を一度で分析することができ、遺伝子機能の解明を
- 25

極めて効率的に行うことができる。また、変異導入の対象としてマウスを例にとると、従来のES細胞への変異導入法であれば、1つの細胞からわずか1匹のトランスジェニックマウスしか得られなかった。本発明を使用すれば、さらにメチル化により転移効率が上がることから、遺伝子の解析効率が飛躍的に上昇する。

一方、本発明のトランスジェニック生物作製方法によれば、得られた「ほぼ全細胞に少なくとも1つの非自己完結型トランスポゾンおよび少なくとも1つのシグニチャー部位からなる群がら選ばれる少なくとも1種を有するトランスジェニック生物（例えばマウス）」を種マウスとすると、1匹の個体から1万種類10 類のトランスジェニック個体を産ませることができる。即ち、1匹のマウスから膨大な種類の転移をもつ子が産まれるとの利点があり」、生命現象を解明するために種々雑多な変異個体を得ることができる。

本発明によれば、得られたトランスジェニック生物を交配することで、転移が固定された遺伝子解明上有用な生物を得ることが可能である。ここで「転移15 が固定された」とは、活性なトランスポザーゼを有さないためトランスポゾンの転移によるシグニチャー部位数が増加しないことを意味する。具体的には、少なくとも1つのシグニチャー部位を有しトランスポゾンが存在するがトランスポザーゼが存在しないまたは不活性である場合、少なくとも1つのシグニチャー部位を有するがトランスポゾンが存在しない場合のいずれかを指す。この20 ようなトランスジェニック哺乳動物個体が得られれば、1個体を調べることで、対応する1種の遺伝子機能をシンプルに解析することができる。また、特定の変異を有する個体について、その成長過程に伴い該変異の影響を調べることができる。また、こうした生物の中で何らかの機能を欠損したものについて、例えばスプライスアクセプターを含むトランスポゾン配列を用い、トランスポザーゼをその受精卵に加えるかあるいはトランスポザーゼを有する生物と交配25 することで該トランスポゾン配列を除去し、その結果機能が回復するかどうかを

見ることにより、特定の機能に関与する原因遺伝子を確認することができる。
本発明では、トランスポゾンにより変異を導入しているため、突然変異誘発物質などを用いて変異を導入するのと比較して、どこに変異が導入されたのかをシグニチャー配列あるいはトランスポゾン構築物由来の配列を利用してPCR等の適当な方法により、容易に検出することができる。また、本発明の実施態様においては、培養細胞でなく個体の生物で遺伝子変異を導入することにより、個体レベルでの遺伝子機能の解析が可能である。また、生物個体を生存させたままの状態では操作が困難な組織に対しても、外部から手を加えることなしに、個体体内で遺伝子変異を導入し得る。さらに、同じ組織内であっても転移部位が異なり、従って遺伝的に異なる一群の細胞が存在するので、血液系、免疫系などの任意の組織・臓器・器官で、増殖、分化等における細胞系譜を系統的に調べることができる。

本発明によれば、本発明の新規な生物、特にマウスは、遺伝子機能解明のための便利なモデルシステムを提供する。本発明のこの実施態様は、生きた動物モデルにおいて遺伝性疾患の研究のための疾患モデルシステムを提供し得る。該システムにおいて、動物モデルに導入される疾患遺伝子としては、ヒト疾患原因遺伝子、または生物におけるその相同遺伝子がcDNAの遺伝子全長、cDNAの遺伝子断片、ゲノムDNAの遺伝子全長、あるいはゲノムDNAの遺伝子断片であるものが挙げられる。疾患原因遺伝子は、生物に導入して、得られたトランスジェニック生物をヒト疾患モデル動物として研究に供し得るものであればいずれでも良く、特に限定されないが、ヒト疾患原因遺伝子であるのが好適である。本発明によれば、種々のエンハンサーを含むトランスポゾンが癌原遺伝子の近傍に転移した場合、これらを包含する細胞においては結果的に癌が発現するため、これにより癌原遺伝子をスクリーニングできる。特に、トランスポゾン配列およびトランスポザナーゼ遺伝子を両方含むトランスジェニック生物を用いた場合、癌原遺伝子の発現はクローナルであるため、癌は組織だ

けでなく全体に転移し得る。また同時に、各動物細胞内で転移による遺伝子機能の低下、破壊ないし活性化がランダムに進行しているので、複数の癌が同一個体内で発生することも予測され、癌に関与する遺伝子機能の解明を効率よく進めることができる。さらに、同一個体内で複数の癌を認めた場合、各々の癌細胞においてトランスポゾンベクターの挿入部位が同じかどうかを調べることで、癌細胞が同一の細胞に由来しているかどうかを調べることができ、癌の転移のメカニズム研究に寄与し得る。

本発明では、本発明のトランスジェニック生物を臓器提供用ドナーとして使用することができる。例えば、ヒトへの異種間臓器移植のドナーとして考えられる臓器として、具体的には神経細胞、心臓、肺、肝臓、膵臓、腎臓、角膜、皮膚などが挙げられる。この場合、導入される遺伝子は、例えば異種間での臓器移植に拒絶反応を低減する機能を有する遺伝子あるいは生着率の上昇を期待し得る機能を有する遺伝子が好ましい。

トランスジェニック生物の作製についてはまた、米国特許第5, 464, 764号公報；米国特許第5, 487, 992号公報；米国特許第5, 627, 059号公報；特開2001-54337号公報；Gossler, A. et al. (1989), Science 244, 463-465；Wurst, W. et al. (1995), Genetics 139, 889-899；Zambrowicz, B. P. et al. (1998), Nature 392, 608-611 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 8932-8935, 1989；Nature, Vol. 342, 435-438, 1989；村松正實、山本雅編集、『実験医学別冊 新訂 遺伝子工学ハンドブック 改訂第3版』（1999年、羊土社発行）中特に239から256頁；相沢慎一（1995）実験医学別冊「ジーンターゲティングーES細胞を用いた変異マウスの作製」などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において、「ノックアウト」とは、遺伝子について言及されるとき、その遺伝子を破壊（欠損）または機能不全にさせることをいう。従って、ノックアウトの概念は、トランスジェニックの中に含まれる。

5 本明細書において、「ノックアウト生物」とは、ある遺伝子がノックアウトされた生物（例えば、マウス）をいう。従って、ノックアウト生物の概念は、トランスジェニック生物の中に含まれる。

本明細書においてトランスジェニックの対象とされる「生物」は、トランスポゾンが作用し、そのような系が機能し得る任意の生物が含まれる。このような生物には、動物、植物、細菌などが含まれるがそれらに限定されない。

10 本明細書において、「動物」は、核酸配列（好ましくは遺伝子をコードする外来配列）の導入を目的とすることができるものであればどのような動物であってもよい。従って、動物には、脊椎動物および無脊椎動物が包含される。動物としては、哺乳動物（例えば、マウス、イヌ、ネコ、ラット、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、イルカ、クジラ、ヤギ、ウマなど）、鳥類（例えば、ニワトリ、ウズラなど）、両生類（例えば、カエルなど）、爬虫類、昆虫（例えば、ショウジョウバエなど）などが挙げられる。好ましくは、動物は、哺乳動物であり得、より好ましくは、ノックアウトを作製することが容易な動物（例えば、マウス）であり得る。別の好ましい形態では、動物は、ヒトのモデル動物として適切であることが判明している動物（例えば、サル）であり得る。ある実施形態では、動物は、非ヒト動物または非ヒト哺乳動物であり得るが、それに限定されない。例えば、ブタ、サル・ウシ・ウマ・ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、またはハムスター等であり、より好ましくは、マウスまたはラットである。ここで本発明の生物には、特に言及しない限り、哺乳動物個体だけでなく個体の一部および個体の有する臓器、器官も包含される。

20 これらはヒト疾患モデルとして、また臓器移植用ドナーとして有用である。

25

本明細書において用いられる「植物」とは、植物界に属する生物の総称であ

り、クロロフィル、かたい細胞壁、豊富な永続性の胚的組織の存在、および運動する能力がない生物により特徴付けられる。代表的には、植物は、細胞壁の形成・クロロフィルによる同化作用をもつ顕花植物をいう。「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。好ましい植物としては、例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ、オオムギ、ソルガムなどのイネ科に属する単子葉植物が挙げられる。より好ましくは、植物は、イネであり得る。イネとしては、ジャポニカ種、インディカ種のものが挙げられるがそれらに限定されない。より好ましくは、イネは、ジャポニカ種のものであり得る。本明細書において、イネの品種としては、例えば日本晴、ニホンマサリ、コシヒカリ、あきたこまち、どんとこい、ヒノヒカリなどが挙げられるがそれらに限定されない。インディカ種の品種としては、T e t e p、B a s m a t i、I R 8、湖南早などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましい植物は作物に限られず、花、樹木、芝生、雑草なども含まれる。特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器官、植物組織、植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。

イネ科の植物の例としては、O r y z a、H o r d e u m、S e c a l e、S c c h a r u m、E c h i n o c h l o a、またはZ e aに属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシなどを含む。

本発明の生産方法に用いられる植物は、好ましくは単子葉植物であり、より好ましくは、イネ科植物である。さらに好ましくは、イネであり得る。

上述の生物において、遺伝子の導入技術はマイクロインジェクション、核酸フラグメントと陽イオン脂質小胞体またはDNA凝縮試薬との組合せ；ならびに核酸フラグメントをウィルスベクターに導入し、そしてこのウィルスベクターを細胞と接触させること、ならびに粒子ボンバードメントおよびエレクトロ

ポレーションから成る群より選ばれる方法を含む。

本明細書において使用され得るウィルスベクターはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、ヘルペスウィルスまたはアデノ関連ウィルスベクターからなる群より選ばれるものが挙げられるがそれらに限定されない。

- 5 本明細書において「レトロウイルス」とは、RNAの形で遺伝情報を有し、逆転写酵素によってRNAの情報からDNAを合成するウイルスをいう。したがって、「レトロウイルスベクター」とは、レトロウイルスを遺伝子の担い手（ベクター）として使用した形態をいう。本発明において使用される「レトロウイルスベクター」としては、例えば、Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)、Murine Stem Cell Virus (MSCV) にもとづいたレトロウイルス型発現ベクターなどが挙げられるがそれらに限定されない。
- 10

好ましくは、レトロウイルスベクターとしては、pGen-、pMSCVなどが挙げられるがそれらに限定されない。

- 15 本明細書において使用される場合「ジーントラップ（法）」とは、目的の細胞に、例えば、プロモーターを欠いたレポーター遺伝子を導入し、染色体上で活性化されているプロモーターの下流に挿入された場合にのみレポーター活性が検出できることを利用した遺伝子の同定方法をいう。このようなジーントラップは、「ジーントラップベクター」を、真核生物の宿主染色体中に導入して、宿主
- 20 遺伝子を破壊することにより達成される。レポーター遺伝子が挿入された遺伝子は、レポーターとの複合タンパク質を発現するため、そのタンパク質をモニターすることによって遺伝子を同定することが可能である。したがって、相同組換えと同様に本来の遺伝子座にレポーター遺伝子が組み込まれるため、転写調節が完全なレポーター系を作ることができる。この手法を用いることによっ
- 25 て、遺伝子破壊によって変異体を単離する手法では、得られなかった遺伝子の同定を行うことができる。したがって、本発明では、このようなジーントラッ

プ法もまた利用することができる。

本明細書において「ジーントラップベクター」とは、真核生物遺伝子のmRNAが成熟mRNAとなる過程においてスプライシングを受ける現象を利用して、遺伝子中へ挿入されたベクターを選択するためのベクターである。ジーン

- 5 トラップベクターとしては、(1) プロモーターを有さないレポーター遺伝子のコード領域、およびスプライスアクセプター部位を含むDNA配列を含むベクター、または(2) プロモーターを有するレポーター遺伝子のコード領域、およびスプライスドナー部位を含むDNA配列を含むベクター、ならびに(3) これら(1) および(2) の両方のDNA配列を含むベクターが挙げられるが
10 これらに限定されない。

- 上述のようなスプライスアクセプター配列を含むジーントラップベクターは、必要に応じて、ポリA付加シグナルを含んでもよい。スプライスドナー配列を含むジーントラップベクターは、必要に応じて、エンハンサー領域、および/またはmRNA不安定化領域を含んでもよい。ポリA付加シグナルとしては、
15 「AATAAA」が挙げられるが、これに限定されない。

本発明において使用するプロモーターとしては、MC1プロモーター、RNA pol IIプロモーターなどが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明において使用されるエンハンサーとしては、ポリオーマウイルスエンハンサー(PYF441)などが挙げられるがそれらに限定されない。

- 20 本発明において使用されるスプライスドナー配列としては、マウスhprt遺伝子エクソン8スプライスドナーが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明において使用されるスプライスアクセプター配列としては、ヒトbc1-2遺伝子エクソン3スプライスアクセプターが挙げられるがそれらに限定されない。

- 25 本明細書において使用される「レポーター」分子または「レポーター」遺伝子とは、細胞内において遺伝子発現の指標として使用することのできる分子(例

例えば、ポリペプチド) または遺伝子をいう。そのような分子としては、公知のレポータータンパク質を用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -グルクロニダーゼ (GUS)、 β -D-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グリーン蛍光タンパク質 (GFP)、またはエクオリンなどが挙げられる。ここで、遺伝子の導入方法自体は、当該分野において公知の技術をもちいて所望の材料を用いて行うことができる。そのような場合、例えば、目的とする胚性幹細胞に、例えば、プロモーターを欠いたレポーター遺伝子 (例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、アルカリホスファターゼ遺伝子、Creレコンビナーゼ遺伝子など) を導入し、染色体上で活性化されているプロモーターの下流に挿入された場合にのみレポーター活性が検出する。使用されるベクターはこのレポーター遺伝子のほか、選択マーカー遺伝子 (例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、レスキューマーカー遺伝子 (例えば、アンピシリン耐性遺伝子+コリシンE1複製開始起点) などを含んでいてもよい。ここで、選択マーカー遺伝子は、ベクターが入った宿主を選択するために使用される。レスキューマーカー遺伝子は、ベクターをレスキューするために使用される (Joyner, A. L. ed." Gene Targeting, 2nd edition" (Oxford University Press, 2000) を参照のこと)。

20 上述のような技術を用いることによって、胚性幹細胞が生成される。この改変胚性幹細胞は、遺伝子がトラップされている。ここで、トラップされているとは、ゲノムへのトラップベクターの挿入により内在性遺伝子が破壊され、同時にそのベクターによって破壊された遺伝子がマーキングされた状態をいう。

特定の配列を有するオリゴヌクレオチドの調製は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができ、例えば、Joyner, A. L. ed." Gene Targeting, 2nd edition" (Oxford Unive

rsity Press, 2000)に記載される方法で行うことができる。
オリゴヌクレオチドは、必要に応じて、蛍光、放射能などで標識することができる。そのような標識方法は当該分野において周知であり、本明細書において引用される文献に記載されている。

5 (スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の方法または生物を使用することができる。本発明では、種々のトランスジェニック生物が作製
10 されることから、任意の核酸分子およびその機能調節因子をスクリーニングすることができる。

本発明では、任意の核酸分子を本発明の核酸分子、方法またはシステムを利用することによってスクリーニングすることができる。本発明はまた、そのようなスクリーニングによって同定された化学物質またはその組み合わせを包含
15 することが企図される。

本発明のトランスポゾンシステムは種々の分野に応用できる。例えば、1) 本発明の方法を利用して生物の染色体への遺伝子材料を効率的に挿入することができる；2) 挿入変異因子としてのトランスポゾンの利用により、生命体の成長、維持、調節および発育に関わる遺伝子の同定、単離および特性を決定
20 することができる（例えば、Kaiserら、1995「Eukaryotic transposable elements as tools to study gene structure and function」Mobile Genetic Elements, IRL Press, pp. 69-100）；3) 生命体の成長、維持、調節および発育を調節する転写調節
25 配列の同定、単離およびその同定することができる（例えば、Andersonら、1996, Mol. Mar. Biol. Biotech., 5, 105-

1 1 3)。一例において、本発明の方法およびシステムは無菌遺伝子導入マウスを作るために利用できる。活性化遺伝子を有する同腹群を交配させ、生物的封じ込めまたは養殖魚の成長率を最大にするために無菌子孫を作ることができる。

(遺伝子治療)

- 5 本発明の用途としては、核酸フラグメントを修飾して細胞に遺伝子治療を施す遺伝子を組込むことが挙げられる。遺伝子は組織特異的プロモーターのコントロール下、または汎用プロモーター、またはその遺伝子を必要とする細胞における遺伝子の発現のための1もしくは複数のその他の発現コントロール領域のコントロール下に置く。遺伝子治療に使用される遺伝子としては、例えば、
- 10 嚢胞性線維症のためのCFTR遺伝子、肺疾患のための α -1-アンチトリプシン、免疫系疾患のためのアデノシンデアミナーゼ(ADA)、血液細胞疾患のための1 \times 因子およびインターロイキン-2(IL-2)、ならびに癌治療のための腫瘍壊死因子(TNF)などが挙げられるがそれらに限定されない。

- 遺伝子治療に使用することが可能な遺伝子配列は公知のデータベース、例えばGenBank、DDBJ、EMBL等において検索し、入手できる。
- 15

- さらに、本発明は、ライブラリーで作業するまたはそれをスクリーニングするための工程の一部として、配列の機能を評価するため、またはタンパク質発現をスクリーニングするため、または特定の細胞タイプに対する特定のタンパク質または特定の発現コントロール領域に対する効果を評価するために利用することができる。1つの実施形態において、組換え配列のライブラリー、例えばコンビナトリアルライブラリーまたは遺伝子シャフリングの生成物を本発明の核酸フラグメントの中に組込んで、一定の逆方向反復配列の間に配置された様々な核酸配列を有する核酸フラグメントのライブラリーを作る。次いでこのライブラリーを前述の通りSBタンパク質などのトランスポザラーゼと一緒に細胞の中に導入する。
- 20
- 25

本発明の利点は、それが逆方向反復配列の間に配置される介在核酸配列のサ

イズを著しく制約しないというトランスポゾントランスジェニック生物作製システムの利点をフルに活用することができ、メチル化により効率が飛躍的にアップすることである。このSBタンパク質は1.3キロベース(kb)～約5.0 kbのトランスポズンを組込むのに利用されており、marinerトランスポザナーゼは約13 kbまでのトランスポズンを移動させた。SBタンパク質を用いて細胞のDNAの中に組込むことのできる核酸配列のサイズにわかっている制限はない。

発明を実施するための最良の形態

10

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。

1つの局面において、本発明は、トランスポズンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子を提供する。このような核酸分子は、予想外に、宿主内でのトランスポゾン活性を保持し、活性化することができるという優れた効果を持つ。このような効果により、本発明は、どのような生物であってもトランスジェニック生物を作ることが可能になったという優れた有用性を有する。

20

好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する。ここで含まれる所望の遺伝子は、どのような遺伝子であってもよく、その遺伝子は、核酸分子が使用される用途によって適宜選択することができる。

25

好ましい実施形態において、本発明において使用される核酸分子におけるメチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在することが有利であ

り得るがそれに限定されない。理論に束縛されないが、特にCG配列にメチル基が存在することによって、染色体がヘテロクロマチン化するという現象が生じることが考えられ、トランスポゾンの転移効率に多大な効果を与えるからである。

- 5 本発明において使用されるトランスポゾンは、どのような形態であってもよいが、好ましくは、DNA型が用いられる。DNA型であれば、メチル化の効果が発揮されやすいからである。好ましくは、本発明において使用されるトランスポゾンはTc1/mariner型に属する。理論に束縛されないが、この型に属するトランスポゾンは、染色体内に組み込まれたときに染色体がヘテロクロマチン化するという現象が生じることが考えられ、トランスポゾンの転移効率に多大な効果を与えるからである。
- 10

- もっとも好ましい実施形態では、本発明によって用いられるトランスポゾンはSleeping Beautyを含む。このトランスポゾンは、本明細書において他の場所において詳述したように、種の壁を簡単に越えて利用することが可能であるからである。
- 15

- 好ましくは、本発明の核酸分子では、所望の遺伝子は、トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されるとトランスポゾンに作動可能に連結され得るように構成される。トランスポゾンが作動するように連結するには、例えば、逆方向反復配列を適宜配置したりすることが挙げられるがそれらに限定されない。
- 20

- 好ましい実施形態では、本発明の核酸分子は、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。外来遺伝子を宿主内に導入することは、たとえ、本発明の核酸分子がインビトロで効果が見られたとしても予想すらできない効果である。ましてや、メチル化の効果がまったくわかっていない状況では、予想の鍵すらないことに鑑みると、本発明のメチル化による外来遺伝子の宿主ない導入の効率化は格別の効果であるといえる。
- 25

本明細書において、本発明が対象とする生物（宿主）は、トランスポゾンが作動する限りどのような生物であってもよく、真核生物を含むがそれに限定されない。好ましくは、本発明が対象とする宿主は、哺乳動物（例えば、マウス、ラットなどのげっ歯類；霊長類など）を含むがそれに限定されない。トランス
5 ポゾンが作動するかどうかは、ここの動物を実験することによって確認することができる。

本発明の好ましい実施形態において、本発明の核酸分子では、その核酸分子が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用することが有利である。このように構成されることによって、遺伝子の転移がスムーズに行わ
10 れることができる。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列を有する遺伝子カセットであって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、遺伝子カセットを提供する。ここで、含まれる核酸分子は、上述のような特徴を有し得る。本明細書において「遺伝子カセット」には、
15 他の要素が付着していてもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有するベクターであって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、ベクターを提供する。ここで、トランスポゾンにコードする配列およびメチル化については、本
20 明細書の他の場所において記載されている。ベクターは通常環状をしているがそれに限定されない。ベクターには、遺伝子の転写、翻訳、発現を調節する要素が付着していてもよい。そのような要素は、好ましくは作動可能に連結され得る。

好ましくは、このベクターは、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。本発明のベクターは、従来不可能であったかまたは困難であった生物種
25 でさえ、トランスジェニック生物を作製することが可能になったという効果が

達成される。特に、SBではトランスジェニック生物が作製できないとされていた哺乳動物において、ベクターを用いた形態でトランスジェニック生物を作製することができるようになったということは、簡便に外来遺伝子を挿入することができる系が利用可能になったことを意味する。したがって、このような系の有用性は、多大である。

本発明のベクターは、核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用するように構成することができる。

本明細書において、「シグニチャー部位」とは、トランスポゾン配列が切り出されて転移した結果として現れる部位を指す。例えば、本発明でSBトランスポゾンを用いた場合、シグニチャー部位は、標的配列であるTAの重複の間にトランスポゾン末端配列の3塩基が挿入された「TAcagTA」あるいは「TActgTA」という配列を含む。但し、トランスポゾンが移動してもシグニチャー部位が上記特定の完全な配列を有しない場合もあり、本発明においては、こうした不完全な配列を含む部位もシグニチャー部位と見なすことができる。

別の実施形態において、本発明では、本発明の核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用するようにベクターが構築される。このような構築は、本発明においてトランスポゾンをコードする配列部分が少なくともメチル化されていることによって達成され得る。

別の実施形態において、本発明は、ゲノム上に挿入される外来核酸分子に対してトランスポザーゼを作用させるための組成物を提供する。この組成物は、トランスポゾンをコードする核酸配列、および該外来核酸分子を含み、該トランスポゾンをコードする配列はメチル化されていることを特徴とする。ここで、外来核酸分子はメチル化されていてもメチル化されていなくてもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンをコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む細胞を提供する。ここで、この核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されてい

ることが特徴である。このような細胞を用いることによって、トランスジェニック生物を容易に作製することができることが本発明によって判明した。従って、本発明は格別の有用性を有する。本発明の細胞に含まれ得る核酸分子は、上述のトランスポゾンにコードする配列を含むものであれば、どのようなものであってもよい。ただし、そのような配列は、保持される細胞において機能的であることが好ましい。好ましくは、そのような細胞は、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。このような宿主は、その細胞と同じ種類であることが好ましいが必ずしも必要というわけではない。

本発明の細胞は、どのような種類の細胞であってもよいが、好ましくは、真核生物細胞を含み、より好ましくは、哺乳動物細胞を含み、さらに好ましくは、げっ歯類細胞を含むがそれらに限定されない。より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物のものが有用である。むしろ、本発明の細胞は、導入する核酸分子の性質、目的、核酸分子が導入されるべき宿主との関係で決定されるべきである。本発明の細胞に含まれる核酸分子は、本発明のベクターであってもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む組織を提供する。ここで、この核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されていることが特徴である。このような組織を用いることによって、トランスジェニック生物を容易に作製することができることが本発明によって判明した。従って、本発明は格別の有用性を有する。本発明の組織に含まれ得る核酸分子は、上述のトランスポゾンにコードする配列を含むものであれば、どのようなものであってもよい。ただし、そのような配列は、保持される組織において機能的であることが好ましい。好ましくは、そのような組織は、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。このような宿主は、その組織と同じ種類であることが好ましいが必ずしも必要というわけではない。

本発明の組織は、どのような種類の組織であってもよいが、好ましくは、真核生物組織を含み、より好ましくは、哺乳動物組織を含み、さらに好ましくは、げっ歯類組織を含むがそれらに限定されない。より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物のものが有用である。むしろ、本発明の組織は、導入する
5 核酸分子の性質、目的、核酸分子が導入されるべき宿主との関係で決定されるべきである。本発明の組織に含まれる核酸分子は、本発明のベクターであってもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンをコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む生物を提供する。
10 この生物では、上記核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されていることが特徴である。本発明の生物に含まれる核酸分子は、上述のトランスポゾンをコードする配列を含むものであれば、どのようなものであってもよい。ただし、そのような配列は、保持される生物において機能的であることが好ましい。好ましくは、そのような生物は、外来遺伝子を宿主内に導入する
15 ために使用される。このような宿主は、その生物と同じ種類であることが好ましいが必ずしも必要というわけではない。このような生物は、トランスジェニック生物を作製するために有用である。

本発明の生物は、どのような種類の生物であってもよいが、好ましくは、真核生物生物を含み、より好ましくは、哺乳動物生物を含み、さらに好ましくは、
20 げっ歯類生物を含むがそれらに限定されない。より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物のものが有用である。むしろ、本発明の生物は、導入する核酸分子の性質、目的、核酸分子が導入されるべき宿主との関係で決定されるべきである。本発明の生物に含まれる核酸分子は、本発明のベクターであってもよい。

25 好ましい実施形態において、本発明の生物は、所望の遺伝子とその生物に由来しないものであることが好ましい。そのような場合、所望の遺伝子は、外来

遺伝子という。外来遺伝子として導入されるものは、どのようなものでもよく、目的の遺伝子によって変動し得る。

別の局面において、本発明は、トランスジェニック生物を作製するための方法に関する。この方法は、A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、
5 単離された核酸分子を提供する工程；B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；C. 該生殖細胞において該トランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択する工程；D. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する。

トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を提供
10 することは、当該分野において公知であり、あるいは、周知である技術を用いて達成され得る。該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換することもまた、当該分野における周知技術（例えば、本明細書において記載されるような遺伝子組み換え技術）を用いて行うことができる。生殖細胞においてトランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択することもまた、
15 当該分野において周知の方法を用いて行うことができる。具体的には、この生殖細胞から核酸分子（例えば、DNA）をメチル化が破壊されないように取り出し、その核酸分子を脱メチル化し、質量が変化するかどうか、およびそのメチル化されている部分の配列を必要に応じて決定することによって行うことができる。形質転換された生殖細胞を用いて生物を再生するもまた、植物に応じて
20 適宜適切な方法を当業者は選択することができる。

好ましい実施形態において、本発明のトランスジェニック生物が対象とする生物は、真核生物である。本発明におけるトランスポゾンのメチル化の効果がより発揮されやすいからである。

別の好ましい実施形態において、本発明のトランスジェニック生物が対象とする生物は、哺乳動物を含む。本発明におけるトランスポゾンのメチル化の効果がより発揮されやすいからである。ここで、より好ましくは、この哺乳動物
25

は、げっ歯類動物であり、より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物である。

別の局面において、本発明は、トランスジェニック生物を作製するための方法を提供する。この方法は、A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子を提供する工程；B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；ならびにC. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する。

トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子を提供する工程は、本明細書において上述されたように、十分に説明されており、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。

本発明の方法において、核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換することもまた、当該分野において周知の技術を用いて実施することができる。

本発明の方法において、形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生することもまた、生物に応じて適宜適切な方法を選択することによって、当業者は容易に実施することができる。

別の好ましい実施形態において、本発明のトランスジェニック生物が対象とする生物は、哺乳動物を含む。本発明におけるトランスポゾンのメチル化の効果がより発揮されやすいからである。ここで、より好ましくは、この哺乳動物は、げっ歯類動物であり、より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物である。本発明は、このように、モデル動物を、容易に、ほぼ自動的に確率の高い方法で、トランスジェニック体とすることができるようになった。従って、本発明は、従来技術にはない格別な効果を有する。

別の局面において、本発明はまた、トランスジェニック生物を作製するためのキットを提供する。ここで、このキットでは、A. トランスポゾンにコード

する核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子；B. トランスポザーゼが包含される。

本発明のキットに含まれる核酸分子は、本明細書において上述したように、
5 トランスポゾンにコードする部分がメチル化されており、そのような核酸分子は、天然由来またはメチル化酵素によって人工的に作製することができる。また、トランスポザーゼは、キットに含まれるトランスポゾンに対して作動することができるものが使用され得る。

1つの実施形態において、本発明のキットには、核酸分子およびトランスポ
10 ザーゼの使用法を記載する説明書が備えられる。この説明書は、紙媒体であってもよいが、伝送媒体（例えば、ネットワーク上の情報）であってもよい。この説明書には、核酸分子の扱い、形質転換法、培養法、再生法、トランスポゾンのインキュベーション法など、トランスジェニック生物に関する種々のプロ
15 トコルが記載されている。記載は、単言語であってもよいが、二言語以上の言語が併記されていてもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子の、トランスジェニック生物の作製のための使用に関する。このようなメチル化された核酸分子の、トラン
20 スジェニック生物への使用は従来知られておらず、自明ではない概念である。このような核酸分子に関する説明は、本明細書において上述したとおりであり、種々の改変が可能である。

別の局面において、本発明は、少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントを提供する。このフラグメントは、該逆方
25 向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組み込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチ

ドがメチル化されている。ここで、逆方向反復配列としては、任意の物を使用することができるが、例えば、配列番号 22-26 に記載されるような物を例示することができる。ここで核酸配列としては、例えば、外来遺伝子の少なくとも一部または全部を含んでいてもよい。好ましくは、核酸配列は、少なくとも一つの発現制御領域を含む。そのような発現制御領域としては、例えば、プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサーなどを挙げることができるがそれらに限定されない。

1 つの実施形態において、本発明の核酸フラグメントは、外来遺伝子の少なくとも一部をさらに含み、ここで、核酸フラグメントに含まれる核酸配列は、
10 該外来遺伝子の少なくとも一部をコードする配列と作動可能に連結される。

1 つの実施形態において、この細胞は、どのような生物のものであってもよいが、好ましくは動物由来である。好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞は脊椎動物（例えば、霊長類またはげっ歯類（例えば、ラット、マウスなど）のような哺乳動物）、である。

15 ここで使用される細胞の DNA は、細胞ゲノム、エピソームおよびプラスミドなどの任意の細胞に存在する DNA であり得る。

本発明において使用される少なくとも 1 つの逆方向反復配列は、配列番号 20 もしくは 21 に記載される配列、またはその一部を含む。

1 つの実施形態において、本発明において使用されるトランスポザーゼは、
20 S B タンパク質である。本発明において使用されるトランスポザーゼはまた、配列番号 3 に対して少なくとも 80 % の、好ましくは少なくとも 90 %、より好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸相同性を有する。あるいは、本発明において使用されるトランスポザーゼをコードする核酸分子は、配列番号 2 に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列または配列番号 3 に示すアミノ酸配列をコードする核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。あるいは、本発明において使用されるトランスポザーゼは、
25

配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に対して 1 または数個のアミノ酸の、置換、付加、または欠失を有していてもよい。

別の好ましい実施形態では、本発明の核酸フラグメントにおいて含まれる少なくとも 1 つの逆方向反復配列が少なくとも 1 つの直列反復配列を含み、該直
5 列反復配列は、配列番号 2 6 に記載される塩基配列または該塩基配列に対して
少なくとも 80 % 相同な塩基配列を含む。

別の好ましい実施形態では、本発明において含まれる少なくとも 1 つの逆方向反復配列が少なくとも 1 つの直列反復配列を含み、好ましくはこの直列反復配列は、配列番号 2 2 ~ 2 5 に記載される核酸配列からなる群より選択される。

10 別の局面において、本発明は、細胞中の DNA に別の DNA を導入するための核酸導入システムを提供する。このシステムは： A) 少なくとも 2 つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内の DNA に組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチ
15 ドがメチル化された核酸フラグメント；および B) トランスポザーゼまたはトランスポザーゼをコードする核酸、を含む。

好ましい実施形態では、本発明のシステムにおいて使用されるトランスポザーゼは、SB 核酸分子または SB タンパク質であるがこれに限定されず、本発明の核酸フラグメントにおいて使用される任意のトランスポザーゼを利用する
20 ことができることが理解される。あるいは、本発明において使用されるトランスポザーゼは、配列番号 3 に記載されるアミノ酸配列またはその改変体を有するか、または前記トランスポザーゼをコードする核酸配列は、配列番号 2 に記載される核酸配列またはその改変体であり得る。

ここで、本発明において使用されるトランスポザーゼをコードする核酸は、好
25 ましくは、細胞ゲノムに組み込まれる。

1 つの実施形態では、本発明のシステムは、プラスミドまたはウイルスベク

ターをさらに含み、該プラスミドまたはウイルスベクターは、前記核酸フラグメントをその一部として含む。

本発明のシステムにおいて含まれる核酸フラグメントは、外来遺伝子をコードする配列の少なくとも一部を含む。

- 5 別の好ましい実施形態では、本発明のシステムにおいて含まれる核酸フラグメントは、使用される細胞の中に、粒子ボンバードメント；エレクトロポレーション；マイクロインジェクション；遺伝子導入試薬の利用；およびウイルスベクターの利用からなる群より選択される方法を用いて導入される。粒子ボンバードメント、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子導入試薬、ウイルスベクターなどは、当該分野において公知の任意の技法を用
- 10 いることができることが理解される。

- 別の局面において、本発明は、トランスジェニック生物を生産するための方法を提供する。この方法は、核酸フラグメントおよびトランスポザーゼを多能性細胞に導入する工程であって、該核酸フラグメントは、少なくとも2つの逆
- 15 方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメントである、工程；および該細胞を生物体へと成長させる工程；を包含する。ここで、核酸フラグメントおよびトランス
- 20 ポザーゼの細胞への導入は、当該分野において周知の任意の核酸またはペプチドの導入法を用いることができることが理解される。細胞を生物体へと成長させる方法もまた、分化因子などを適宜使用しながら実施することができることが理解される。あるいは、多能性細胞として、卵母細胞、胚細胞、卵および幹細胞からなる群より選択される細胞を用いることによって、通常の条件で成長させて生物体を生産することができることが理解される。
- 25

ここで好ましくは、使用される生物は、げっ歯類（例えば、マウスまたはラ

ット) または霊長類である。

別の局面において、本発明は、核酸を細胞中のDNAに導入するための方法を提供する。この方法は、核酸フラグメントを細胞に導入する工程であって、該核酸フラグメントは、少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸
5 配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、該トランスポザーゼの存在下で細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメントである、工程を包含する。

1つの実施形態において、本発明は、さらに、トランスポザーゼを前記細胞
10 中に導入する工程を包含していてもよい。ここで、使用されるトランスポザーゼは、配列番号3と少なくとも80%の相同性を有していてもよく、他の改変体であってもよい。そのような改変体の例は、本明細書において他に例示されている。

1つの実施形態において、本発明において使用される細胞は、トランスポ
15 ーゼをコードする核酸を含む。このような核酸を含むことによって、外来のトランスポザーゼを導入する必要を回避できる。好ましくは、この核酸は、細胞ゲノムに組み込まれる。恒常的に発現することができるからである。従って、このようなトランスポザーゼは、細胞中では、安定に発現されることが好ましくあり得る。あるいは、トランスポザーゼは、誘導性プロモーターに制御下に
20 あるように作動可能に連結され、一過的に発現されてもよい。このような安定な発現または一過的な発現は、目的とする実験に応じて適宜使用し分けることができることが理解される。

本発明の方法では、挿入される配列は、タンパク質をコードすることが好ましい。そのようなタンパク質としては、例えば、マーカータンパク質、蛍光タ
25 ンパク質、生理活性タンパク質などを挙げることができるがそれらに限定されない。

別の局面において、本発明は、細胞内の核酸配列を移動させるための方法を提供する。この方法は、少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント、を含む細胞の中に、トランスポザーゼを導入する工程、を包含する。ここで、このトランスポザーゼは、該細胞のDNA中の第一の位置から該DNAの第二の位置に該核酸配列を移動させる。このような細胞内の遺伝子の移動は、トランスポゾンシステムが得意とする機能であり、メチル化によって、トランスポゾンシステムの移動効率が飛躍的に上昇する。

本発明の核酸配列の移動方法において、細胞のDNAはゲノムDNAであることが好ましく、第一の位置または第二の位置は、染色体外DNAであってもよいがそれに限定されない。染色体外DNAが関与することによって、遺伝子のオンオフをより単純に行うことができるようになる。ここで、トランスポザーゼは、前記細胞中に核酸として導入することが好ましい。

別の局面において、本発明は、細胞内の遺伝子を同定するための方法を提供する。ここで、この方法は、少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、上記逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、上記核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント、およびトランスポザーゼを、細胞の中に導入する工程；上記細胞中のDNAを、上記核酸配列を切断することができる制限エンドヌクレアーゼで消化する工程；上記逆方向反復配列を同定する工程；上記逆方向反復配列に近い核酸の配列を決定する工程；および上記配列と配列情報データベース内の配列情報と比較する工程、を包含する。ここで、核酸フラグメントおよびトランスポザーゼの細胞への導入は、当該分野において周知の任意の技法を

用いることができることが理解される。また、エンドヌクレアーゼは、当該分野において公知の任意の酵素を用いて、例えば、供給業者のマニュアルを用いて切断・消化を行うことができることが理解される。逆方向反復配列の同定は、例えば、特異的な塩基長あるいは切断パターンの同定、配列決定などによって

5 行うことが理解される。配列が決定されると、当該分野において公知の方法により、既存のデータベースまたは自分で作成したデータベースなどと比較することができる。このようにして比較することによって、遺伝子の機能を同定することができる。そのような同定は、例えば、種々の生物学的アッセイを行うか、表現型を観察するなどの技法を用いることができることが理解される。

- 10 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

- 以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の
- 15 実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

実 施 例

- 20 以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。以下の実施例において用いられる試薬などは、例外を除き、Sigma (St. Louis, USA)、和光純薬 (大阪、日本)、などから市販されるものを用いた。動物の取り扱い、大阪大学医学部において規定される規準を遵守して行った。本発明で用いる発現ベクターの作製方法
- 25 を具体例を挙げて説明する。なお、このような例で用いられる出発プラスミド、プロモーター等の構成要素を同等のもので置き換えて実施することは当業者に

とって容易である。

以下、本発明の内容を実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

5

(材料および方法)

(プラスミドの構築およびメチル化)

セリンパルミトイルトランスフェラーゼ長鎖塩基性サブユニット (S p t l c 2) 遺伝子座にS Bトランスポゾンを導入するためのターゲティングベクターを、p B l u e s c r i p t I I (p B S ; S t r a t a g e n e) のX h o I - K p n I部位にエキソン5を含むS p t l c 2遺伝子の5 k b X h o I - K p n Iフラグメントの最初のクローニングによって作製し、p B S - S p t l c 2を得た。次いで、p C X - E G F P - P i g A (H o r i e , K . , A . K u r o i w a , M . I k a w a , M . O k a b e , G . K o n d o h , Y . M a t s u d a , およびJ . T a k e d a . 2 0 0 1 ; P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 8 : 9 1 9 1 ~ 9 1 9 6) のS a l I - B a m H Iフラグメントおよび1 5 0 b pの合成スプライシングドナー部位 (M . I k a w aからのギフト) のB a m H I - N o t Iフラグメントをp B SのS a l I - N o t I部位にクローニングし、その後、B a m H I部位を欠失させ、p C X - E G F P - S Dを作製した。p C X - E G F P - S Dの平滑末端化したS a l I - N o t Iフラグメントを、p B S - I R / D R (R , L) の平滑末端化したE c o R I - B a m H I部位に挿入し、p T r a n s C X - E G F P - S Dを作製した。P G K - n e oカセットを含むp T r a n s C X - E G F P : N e o (H o r i e , K . , A . K u r o i w a , M . I k a w a , M . O k a b e , G . K o n d o h , Y . M a t s u d a , およびJ . T a k e d a . 2 0 0 1 ; P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 8 : 9 1

91～9196)のEcoRI-NoIフラグメントをpBSにクローニングし、この後、BamHI部位を欠失させ、pBS-Neoを作製した。pBS-NeoのNoI-KpnIフラグメントおよびpTransCX-EGFP-SDのKpnI-XhoIフラグメントをpBS-Spt1c2のNoI-XhoI部位に挿入し、ターゲティングベクターを得た。

リコンビナーゼ媒介カセット交換(RMCE)のためのベクターを以下のように構築した。pTransCX-EGFP:NeoのPGK-neoカセットの下流にあるloxP部位を取り除くために、BamHI-AflIIIフラグメントおよびNoI-AflIIIフラグメントを連結し、pTransCX-EGFP:Neo-3'loxPを得た。平滑末端化および全ての切断末端のNoIリンカーライゲーションの後、のClaI-BglIIIフラグメントを、SBトランスポゾン、および両側の約200bpのランキンク配列を含むpTransCX-EGFP:Neo-3'loxPのPvuIフラグメントと置換し、pL1TransCX-EGFP1Lを得た。

pROSA β -geo (Friedrich, G., およびP. Soriano, 1991; Genes Dev. 5:1513～1523)の平滑末端化したXhoIフラグメントを、pTransCX-GFP (Horie, K., A. Kuroiwa, M. Ikawa, M. Okabe, G. Kondoh, Y. Matsuda, およびJ. Takeda, 2001; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9191～9196)の平滑末端化したEcoRI-BamHI部位およびpRP790 (Fischer, S.E., H. G. vanLuenen, およびR. H. Plasterk, 1999.; Mol. Gen. Genet. 262:268～274.)のBspEI-NoI部位にそれぞれクローニングすることによって、pTransSA β -geoおよびpTc3/SA β -geoを構築した。

SBトランスポザラーゼの6-Hisタグ化123アミノ酸N末端フラグメ

ント (N123) の発現のために、N末端フラグメントを、まず以下のプライマー: 5' -CATGCCATGGGAAAATCAAAAGAAATC-3' (配列番号29) および 5' -CCGCTCGAGCAGTGGCTTCTTCCTTG-3' (配列番号30) を用いて pCMV-SB (pSB10) (Ivics, Z., P. B. Hackett, R. H. Plasterk, および Z. Izsvak. 1997; Cell 91: 501~510) から PCR 増幅し、そして、NcoI、BsrGI および ChoI で消化した。次いで、NcoI-BsrGI フラグメント および BsrGI-XhoI フラグメントを NcoI 消化 pET21d (Novagen) および XhoI 消化 pET21d にクローニングし、pET-N123 を得た。

電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) のための IR/DR-L の DNA プローブについて、pTransCX-EGFP:Neo の HindIII-KpnI フラグメントを pBS の HindIII-KpnI 部位にクローニングし、pBS-IR/DR-L を得た。

プラスミド DNA のメチル化を、製造業者のプロトコルに従って SssI CpG メチラーゼ (NEB) を用いて行い、その後、PCR 精製キット (Qiagen) で精製した。完全なメチル化を、メチル化感受性酵素での消化に対する耐性によって確認した。

(細胞培養および遺伝子ターゲティング)

マウスの ES 細胞を、20% の仔ウシ血清、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム および 1 ml あたり 1,000 U の白血病抑制因子を含有するダルベッコの改変イーグル培地中で、マイトマイシン C で処理したマウスの胚性線維芽細胞の上で培養した。マウス赤白血病 (MEL) 細胞クローンである RL5 および RL6⁸ を 1.0% の仔ウシ血清を含有するダルベッコの改変イーグル培地中で培養した。

Spt1c2 遺伝子座への SB トランスポゾンの標的化挿入を、挿入型の相

同組換えによって行った。簡単には、 $25\mu\text{g}$ のターゲティングベクターを相同性領域に位置するBamHIで直線化し、Gene Pulser II (Bio-Rad) を使用してエレクトロポレーション (240V 、 $500\mu\text{F}$) によって、 1.0×10^7 個のES細胞に導入した。細胞を 1ml あたり、 $150\mu\text{g}$ のG418で7日間選択し、その後、耐性クローンをピックアップし、拡大させ、そして、サザンブロット法で分析した。

RMCEを以前に記載されたように実施した (Schubeler, D., M. C. Lorincz, D. M. Cimbora, A. Telling, Y. Q. Feng, E. E. Bouhassira, および M. Groudine. 2000; Mol. Cell. Biol. 20: 9103~9112)。簡単には、 $25\mu\text{g}$ のメチル化または非メチル化プラスミドを、 $20\mu\text{g}$ のCre発現ベクターpBS185および $200\mu\text{g}$ のサケ精子DNAと一緒に用いて、MEL細胞クローンRL5およびRL6に、エレクトロポレーション (250V 、 $1,070\mu\text{F}$) によって導入した。細胞を10日間、エレクトロポレーション後の最初の4日は、 $10\mu\text{M}$ のガンシクロビルで選択した。独立したクローンを単離するために限界希釈を行い、単離した独立クローンを拡大させ、そして、増強した緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の検出のために、プライマーEGFP-1U (5' - CACCCTC GTGACCACCCTGACCTAC - 3' (配列番号31)) およびプライマーEGFP-1L (5' - CTTGATGCCGTTCTTC TGCTTGTCG - 3' (配列番号32)) を、ならびに、HYTKの検出のために、プライマーHYG-1U (5' - CGGGCGTATATGCTCCCCATTGGTCTTGAC - 3' (配列番号33)) およびプライマーTK-1L (5' - TGGTG TAGATGTTCGCGATTGTCTCGGAAG - 3' (配列番号34)) を用いるPCRによってプレスクリーニングした。交換したカセットの方向を、方向DについてプライマーM13F (5' - ACGACGTTGTAAAACGACG

GCCAGT-3' (配列番号35)) およびプライマーRMCE-DL1 (5'-GCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTC-3 (配列番号36))') を、ならびに方向IについてプライマーM13FおよびプライマーRRMCE-IL-1 (5'-AAGTGAGTTTAAATGTATT
5 TGGCTAAGGTG-3' (配列番号37)) を用いて決定した。カセット交換およびメチル化状態をさらに、サザンブロット分析によって確認した。

(雄生殖細胞の単離)

ドナートランスポゾン (Horie, K., A. Kuroiwa, M. Ikawa, M. Okabe, G. Kondoh, Y. Matsuda, および J. Takeda. 2001; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9191~9196) を有するマウスの精巣を被膜剥離し、剃刀を用いて約1mm²のフラグメントに切り刻んだ。生殖細胞を、ピペッティングを繰り返して放出させた。精細管を取り除くための簡単な遠心分離の後、上清を回収し、1, 500×gでさらに遠心分離して沈殿させた。次いで、DNAを細胞ペレットから抽出し、サザンブロット法で分析した。
15

(サザンブロット分析)

ゲノムDNAは、制限酵素で消化され、0.7%アガロースゲルで分画し、HyBond・N+ナイロンメンブレン (Amersham) に移した。EGFPを含むpCX・

20 EGEP (Okabe M. et al., FEBS Lett. 407, 313-9 (1997)) の0.7kb EcoRI断片をトランスポゾン特異的バンドを検出するためのプローブとして使用した。ハイブリダイゼーション及び洗浄を標準的な方法 (J. Sambrook et al. 前出) (1989)) により行った。トランスジェニックマウスのトランスポゾンコピー一致を評価するために、テイルDNAのバンドをBioimaging systemを用いてトランスポゾンの単一コピーを含むES細胞クローンに由来するゲノムD
25

NAのものと比較した。

(PCR分析)

トランスポゾンの切り出しは、以下のプライマーセットを用いたPCRにより検出した：TgTP-2L, 5'-ACACAGGAAACAGCTATG
 5 ACCATGATTACG-3' (配列番号7) およびTgTP-1U, 5'-
 GACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC-3' (配列番号
 6)。各プライマーは、それぞれpTransCX-GFP:NeoのIR/DR
 R (R) およびIR/DR (L) の外側に位置する。PCRは、HotStar
 Taq system (Qiagen) を使い、以下の条件下に行った：

10 95℃15分、50サイクル (94℃1分、59℃1分、72℃1分)、次い
 で最終工程で72℃10分の1サイクル

トランスジェニックマウスの遺伝子型は、以下のプライマー対を用いて決定
 した：

GFP遺伝子に関して (EGFP-1U, 5'-CACGCTGGTGAC
 15 CAGCCTGACCTA3' (配列番号73) およびEGFP-1L, 5'-
 CTTGATGCCGTTCTCTGCTTGTCG-3' (配列番号74))
 および；SBトランスジーンに関して (SB-2U, 5'-TCCTAGAG
 ATGAACGTACTTTTGGT-3' (配列番号75) およびSB-1L,
 5'-ATCCAGATAATTTTCCTTGCTCATG-3' (配列番号
 20 76))。

PCR条件は、アニーリング温度を55℃とし、サイクル数を30とした以
 外は、上記25'と同じであった。得られたPCR産物は、GFP遺伝子に関
 し313bpおよびSBトランスジーンに関し466bpであった。トランス
 ポゾンの新規組込部位でのランニング配列は、既述のようにPCR増幅した
 25 (Ivics, Z. et al., Cell 91, 501-10 (1997))。
 PCR産物はダイターミネーターおよびABI373A DNA配列決定機

(Applied Biosystems) を用いて直接配列決定した。

(GFP発現の測定)

出生直後のマウスの尾の先端を切除し、直ちにGFP・specified
Filter (オリンパス、東京、日本) およびオリンパス蛍光倒立顕微鏡を
5 用いて×40の倍率で蛍光強度を観察する。尾全体にGFP発現を有するマウ
スをポジティブと判定した。

(実施例1：一過性トランスポゾン切り出しアッセイ)

まず、本実施例において、トランスポゾンをコードする配列のメチル化が一
10 過的に切り出し能を上げるかどうかを確かめた。

(一過性トランスポゾン切り出しアッセイ方法)

トランスポゾンDNA (pTransCX-EGFP; neo, Horie
et al., 2001, Proc Natl Acad Sci U S
15 A.; 98: 9191-6) を、SssI CpGメチラーゼ (New Eng
land Biolabs; 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl,
pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 160 μM SAM, 0.
2 U/μl SssI) を用いてあらかじめメチル化しておいた。メチル化自
体の確認はメチル化感受性NotIで消化されないことを確認することによっ
20 て行った。

次に、マウス赤白血病細胞 (MEL細胞、J. Mol. Biol. 292:
779-785, 1999) に、トランスポゾンDNAとSleeping B
eauty (SB) 転移酵素 (PCMV-SB, P. Hackett博士より
入手) とともに導入した。細胞から (DNeasy Tissue Kit,
25 QIAGEN) を用いて全DNAを抽出し、プラスミドベクター上にプライマ
ーを用いてPCR (TgTP-1U, TgTP-2L (前出の配列)) を行い、

切り出し反応が起こった場合に増幅される358bpのPCR産物を検出した。検出は、アガロースによる電気泳動の後、エチジウムブロマイドによる染色によって行った。対象としてサイズマーカーも電気泳動した。切り出しシステムの構成例を図1D(a)に示す。

5

(一過性にトランスフェクトしたトランスポゾンの切り出しアッセイ)

一過性にトランスフェクトしたトランスポゾンの切り出しアッセイのために、
 1. 0×10^6 個のMEL細胞をTransFast (Promega) を使用
 して、1.0 μ gのpSB10またはpBSと一緒に1.0 μ gのメチル化ま
 10 たは非メチル化pTransCX-EGFP:Neoでトランスフェクトした。
 トランスフェクションの48時間後にDNeasyキット (QIAGEN) で
 ゲノムDNAを抽出した。400ngおよび80ngのHindIII消化D
 NAを使用して、HotStarTaqシステム (QIAGEN) で、切り出
 し産物およびneoフラグメントをそれぞれ増幅した。neoフラグメントは、
 15 pTransCX-EGFP:Neoベクター中に存在し、そして、トランス
 フェクション効率についての内部標準として使用した。プライマーTgTP-
 1U (5' -GACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC-3'
 (配列番号6)) およびプライマーTgTP-2L (5' -ACACAGGA
 AACAGCT ATGACCATGATTACG-3' (配列番号38))
 20 を使用して切り出し産物を検出し、そして、プライマーneo-U1 (5' -
 GGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGA-3' (配列番号39))
 およびプライマーneo-L1 (5' -TGGATACTTTCTCGGCA
 GGAGCAAG-3' (配列番号40)) を使用してneoフラグメントを
 増幅した。切り出し産物の増幅は、以下の条件下で行った: 95°Cで15分間、
 25 これに続く、35サイクル、94°Cで1分間、63°Cで1分間および72°Cで
 1分間の35サイクル、その後に、72°Cで7分間の最終伸長。アニーリング

温度が60℃であり、サイクル数が19であることを除いて、neoフラグメントの増幅にも同じ条件を使用した。

切り出し産物およびneoフラグメントはまた、製造業者の説明に従って、
LightCycler FastStart DNA Masterハイブリ
5 リダイゼーションプローブキット (Roche Diagnostics) を
用いて、40 ngの鋳型DNAから、LightCycler装置 (Roche
Diagnostics) でのリアルタイムPCRで定量した。切り出し
産物に対する蛍光標識化プローブは、5' -CGGCCGCTCTAGCGG
TACCCTAC-FITC-3' (配列番号41)、および5' -LCRed
10 640-GTAGGGGATCGACCTCGAGGGG-3' (配列番号4
2) であり、そして、neoフラグメントに対する蛍光標識プローブは、5'
-GCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAG-FITC-3' (配
列番号43) および5' -LCRed 640-GGGAAGGGACTGGC
TGCTATTGGG-3' (配列番号44) であった。切り出し産物に対す
15 るPCRプライマーは、5' -GTTGGGTCGTTTGTTCGGAT-
3' (配列番号45) および5' -CGCGCAATTAACCCTCACT
A-3' (配列番号46) であり、そして、neoフラグメントに対するPC
Rプライマーは、5' -AATGAACTGCAGGACGAGGC-3' (配
列番号47) および5' -ATGGATACTTTCTCGGCAGG-3'
20 (配列番号48) であった。4アトグラム~2.0 pg、そして0.2 pg~
2.0 ngの、標的配列を有するコントロールプラスミドを、それぞれ、切り
出し産物およびneoフラグメントに対する標準として使用した。増幅条件は、
95℃で10分間、それに続く95℃で10行間、55℃で10秒間および7
2℃で10秒間の45サイクルであった。切り出し産物およびneoフラグメ
25 ントを標準曲線に基づいて定量し、正規化のために、切り出し産物の量をneo
フラグメントの量で割った。

(結果)

高頻度の転移は、CpGメチル化に関連する結果を図1A～Cに示す。

(A) 挿入型相同組換えによる単一コピーのSpt1c2遺伝子座へのSB
5 トランスポゾンの導入およびPCRによるトランスポゾン切り出しの検出。白
い四角：エキソン、黒三角：loxP部位、灰色および白の矢印：ネステッド
PCRプライマー、薄い線：プラスミドの骨格配列、CAG：CAGプロモ
ーター、IR/DR-RおよびIR/DR-L：それぞれ、右IR/DRおよ
び左IR/DR、Xb：XbaI、B：BamHI、K：KpnI。

10 (B) ES細胞のSpt1c2遺伝子座でのSBトランスポゾンの切り出し。
Spt1c2遺伝子座に標的化して挿入したSBトランスポゾンを有するES
115 クローン（パネルAに示す）を、段階希釈した野生型のSBトランスポ
ザーゼ（トランスポザーゼ+）を発現するpSB10または、DDEボックス
が欠質した不活性のSBトランスポザーゼ（トランスポザーゼ-）を発現する
15 pSB10-DDE（Ivics, Z.; P. B. Hackett, R. H.
Plasterk, およびZ. Izsvak. 1997; Cell 91: 5
01～510）でトランスフェクトし、パネルAに示すように、ネステッド
PCRでスクリーニングした。pSB10の各希釈因子について4つの独立し
たトランスフェクションを行い、8つの独立したPCRの1反応あたり1μg
20 のゲノムDNAを使用して、各トランスフェクションにおいて8μgのゲノム
DNAをスクリーニングした。pSB10の最大量（2μg）を有する代表的
なPCRの結果を左のパネルに示す。各トランスフェクションについての陽性
PCRの平均数およびSBトランスポザーゼの発現レベルのRT-PCR分析
の結果を右のパネルに示す。Actb：βアクチン。

25 (C) 雄マウスの生殖細胞およびES細胞におけるトランスポゾン配列内の
メチル化状態のサザンブロット分析。EGFPをプローブとして使用した。生

殖細胞由来のゲノムDNAは、H p a I I で消化されなかった。これは、この部位がメチル化ことを示す。一方、E S 1 1 5 クローン由来のゲノムDNAは、ほとんど完全に消化された。かすかなバンドの存在（アスタリスクで示す）は、E S 細胞において、H p a I I 部位の小画分がメチル化ことを示す。黒丸：H p a I I (H) またはM s p I (M) 部位、X : X h o I 部位。KM、K X M およびK X H レーンにおけるH p a I I - M s p I フラグメント由来の0. 5 k b のバンドを矢印で示す。

本実施例の結果を図1 D (b) に示す。写真からも明らかなように、メチル化したトランスポゾン転移酵素とともに導入した細胞において、メチル化していないトランスポゾンよりも顕著に高頻度に切り出し反応が起きていたことが明らかになった。図中、C A G は、C A G プロモーターを示し、E G F P は緑色蛍光タンパク質を示し、p A はポリ A 付加シグナルを示す。L は左 I R / D R を示し、R は右 I R / D R を示す。M は、メチル化を示し、N は非メチル化を示す。N C はネガティブコントロール (M E L 細胞ゲノムDNA) を示す。

従って、メチル化することによって、トランスポゾンにおいて顕著な効果が奏されることが明らかになった。

(実施例 2 : マウスゲノムの同一遺伝子座にメチル化または非メチル化トランスポゾンをもつ細胞の樹立)

次に、細胞レベルでメチル化の転移活性に対する効果があるかどうかを実証した。

(方法)

2つの逆向きの l o x P 配列の間にトランスポゾンを配置したプラスミドベクター (P B S 1 8 5) を構築し、S s s I C p G メチラーゼによりラン

スポンソンをコードする配列をメチル化した。次に、このプラスミドDNAと Cre 組み換え酵素発現ベクターを、逆向きの loxP 配列の間にハイグロマイシン耐性遺伝子とヘルペスウイルスチミジンキナーゼの融合遺伝子 (HYTK) を、外来遺伝子 (トランスジーン) として有する MEL 細胞 (株: RL5、RL6、E. E. Bouhassira, J. Mol. Biol. 292: 779-785, 1999) に導入した。Cre 組み換え酵素によりプラスミドとゲノム上の loxP との間で組み換えが起こり、トランスポソンをゲノムの特定部位に有する細胞を樹立した。これによって、ゲノム上の同一部位において、メチル化が及ぼす切り出し反応の効率化を図ることができた。樹立した細胞に SB 転移酵素を導入し、切り出し反応を実施例 1 に記載のように行って PCR により検出した。この実験フローチャートを図 2A に示す。図 2A では、黒の矢は loxP 部位を示し、白およびグレイの矢は PCR プライマーを示す。CMV は CMV プロモーターを示す。

15 (安定に挿入されたトランスポソンの切り出しアッセイ)

安定に挿入されたトランスポソンの切り出しアッセイのために、 2.0×10^5 個の標的 ES 細胞クローンまたは 1.0×10^6 個の MEL 細胞クローンを、2.0、0.67、0.22、0.074、0.025 および 0.0082 μ g の pSB10 でトランスフェクトし、トランスフェクションの 48 時間後にゲノム DNA を DNeasy キットで抽出した。1 μ g のゲノム DNA を、標的 ES 細胞クローンに対して、プライマー LCB2XL2 (5' -TTCCA
AAAGAAGTAGAGTGGAGAACCAGTG-3' (配列番号 49)) およびプライマー PGK2 (5' -AGGCCACTTGTGTAGCGCC
AAGT-3' (配列番号 50)) を、MEL 細胞クローンに対してプライマー TgTP-1U および TgTP-2L を用いる PCR により分析した。1 μ l の第 1 PCR 産物を鋳型として使用する ネスティッド PCR を、標的 ES 細胞

胞クローンに対して、プライマーLCB2XL1 (5' -CCAACCAAA
TACATTTAACATATTCTAGGT-3' (配列番号51)) およ
びプライマーPGK4 (5' -GCTGCTAAAGCGCATGCTCCA
GACTG-3' (配列番号52)) を、MEL細胞クローンに対してプライ
5 マーTgTP-2U (5' -TCTATCGCCTTCTTGACGAGTT
CTTCTGAG-3' (配列番号8)) およびプライマーTgTP-3L (5'
-CAAGCGCGCAATTAAACCCTCACTAAAGG-3' (配列
番号9)) を用いて行った。PCR条件は、95℃で15分間、それに続く、
94℃で1分間、60℃で1分間および72℃で1分間の30サイクル、その
10 後、72℃で7分間の最終伸長であった。SBトランスポザーゼの発現レベル
を定量するために、製造業者のプロトコルに従ってTRIzol (Invit
rogen) を使用して、総RNAを抽出し、RQ1 RNase-Free
DNase (Promega) で処理した。1 μ gのRNAを、製造業者のプ
ロトコルに従って、20 μ lの最終量中でランダムヘキサマープライマーを用
15 いてSuperscript II (Invitrogen) で逆転写反応を行
い、そして、2 μ lの反応産物をPCRで分析した。PCRプライマーは、S
Bトランスポザーゼ遺伝子の増幅について、5' -AATAGAACTGTT
TGGCCATAATGACCATCG-3' (配列番号53) および5' -
ATCCACATAATTTTCCTTCCTCATG-3' (配列番号54)
20 であり、そして、内部標準として使用した β -アクチン遺伝子の増幅について、
5' -CAGGGTGTTGATGGTGGGAATGGGTCAGAAG-3'
(配列番号55) および5' -TACGTACATGGCTGGGGTGTT
GAAGGTCTC-3' (配列番号56) であった。サイクル数が、SBト
ランスポザーゼ遺伝子について30、そして、 β -アクチン遺伝子について1
25 8である以外は、PCR条件は、切り出し産物の増幅に使用したものと同じで
あった。

(結果)

組み換えが正しく行われたことを示す結果をサザンブロットとして図 2 B に示す。この図には、右側に各株の制限酵素地図を示す。クローン 5 M 1、5 M 2、5 M 3 は、R L 5 由来のメチル化トランスポゾンを導入した細胞株であり、クローン 5 N 1、5 N 2、5 N 3 は、R L 5 由来の非メチル化トランスポゾンを導入した細胞株を示す。また、6 M 1 は、R L 6 由来のメチル化トランスポゾンを導入した細胞株を示す。6 N 1 は、R L 6 由来の非メチル化トランスポゾンを導入した細胞株を示す。予想されたサイズのバンドが検出された。従って、C r e - l o x P を介した組換えが正しく起こったことが示された。ここでは、プローブとして E G F P を用いた。

また、導入したメチル化および非メチル化が維持されていることも確認した。その結果を図 2 C ~ D に示す。実験は、メチル化感受性制限酵素 H p a I I、New England Biolabs) を用いたサザンブロット分析を行った。

左に方向 A および右に方向 B の制限酵素地図およびサザンブロット分析の結果を示す。いずれの場合も、バンドパターンより導入したメチル化は維持されており、非メチル化の場合は新たなメチル化が導入されていないことが確認された。

図 2 E には、所定のゲノムの遺伝子座にメチル化 S B トランスポゾンまたは非メチル化 S B トランスポゾンをもつ細胞の生成を示す。標的クローンにおける E G F P 発現の、蛍光細胞分析分離装置 (F A C S) 分析。灰色の領域：野生型の細胞、薄い線：標的クローン。図 2 E に示すように、メチル化による、

トランスポゾン効率の上昇がタンパク質の発現レベルでも示された。

メチル化トランスポゾンでトランスフェクトしたRL5由来クローンおよびRL6由来クローンの両方において、HpaIまたはSalI部位のどちらも
5 切断されなかった。これは、メチル化状態が維持されていることを示す。対照的に、HpaIおよびSalI部位の両方が、非メチル化トランスポゾンでトランスフェクトした全てのクローンにおいて、完全に切断され、これは、非メチル化状態が維持されていることを示す。これらの結果と一致して、トランスポゾンベクター内のEGFPレポーターの発現は、メチル化トランスポゾン
10 を含む細胞において抑制されたが、非メチル化トランスポゾンを含む細胞においては抑制されなかった（図2E）。トランスポゾン領域のメチル化状態および非メチル化状態の両方が、RMCE反応の後、少なくとも10週間維持された。

15 このように、メチル化による、トランスポゾン効率の上昇がタンパク質の発現レベルでも示され、安定に導入されることが明らかになった。

（実施例3：マウスゲノムの同一部位においてDNAメチル化がトランスポゾン切り出し反応に対して及ぼす影響）

20 実施例2で樹立した細胞株にSB転移酵素（PCMV-SB、P. Hackett、U. of Minnesotaより入手）を導入し、48時間後にゲノムDNAを回収した。ゲノムの回収は、ゲノム抽出キット（DNeasy Tissue Kit, QIAGEN）を用いて行った。ネステッドPCRによってトランスポゾンの切り出しを検出した。各細胞株に対して10回のPCR
25 R反応を行った。1st PCRにおいて1 μ gのゲノムDNAを鋳型に用いて反応を行った。用いたプライマーを示す：

1-1) T g T P-1 U (配列番号6)

1-2) T g T P-2 L (配列番号7)

2-1) T g T P-2 U (TCTATCGCCTTCTTGACGAGTTC
TTCTGAG; 配列番号8) (2nd PCR; ネスティッドPCR)

5 2-2) T g T P-3 L (CAAGCGCGCAATTAACCCTCACT
AAAGG; 配列番号9) (2nd PCR; ネスティッドPCR)

この結果得られた試料の1 μ l をネスティッドPCRの鋳型として用いて次の実験を行った。ネガティブコントロール (NC) として、各細胞株のゲノムDNAを用いた。メチル化を導入したトランスポゾンにおいて、切り出し反応
10 の頻度が顕著に上昇 (少なくとも10倍以上) していることが明らかになった。

図3Aは、マウスゲノムにおける、DNAメチル化のトランスポゾン切り出し反応への効果を示す一例である。

図3B~Cは、所定のゲノムの遺伝子座でのメチル化SBトランスポゾンの
15 高頻度の切り出しの詳細を示す。一部は、図3Aと重複する。図2に示すクローンからの1 μ g または10 ng をネスティッドPCRのための鋳型として使用した。各クローンについて、10のPCRを行った。(B) 方向D; (C) 方向I。NC: ネガティブコントロールとしてのトランスフェクトしていないゲノムDNA、M: 100 bp ラダー。トランスポゾン領域のメチル化状態お
20 よび親クローンを、右に示す。

トランスポゾン切り出しに及ぼすCpGメチル化の影響を決定するために、本発明者らは、SBトランスポザンゼ発現ベクターでクローンをトランスフェクトし、トランスフェクションの48時間後に切り出しを検出するためにPCR
25 Rを行った (図4AおよびB)。非メチル化トランスポゾンを含むクローンにおいて、1 μ g のゲノムDNAを鋳型として使用した場合、切り出しは、10

中1のPCRで検出された（クローン5U1および5U2）か、または検出されなかった（クローン5U3および6U1）。この頻度は、Spt1c2遺伝子座に非メチル化トランスポゾンを含むES細胞について観察されるものと同じであった（図1B）。一方、メチル化トランスポゾンを含むクローンにおいて、切り出しは、全10反応において検出された（クローン5M1、5M2、5M3および6M1）。最初のPCRのためのゲノムDNAが希釈された場合、メチル化トランスポゾンを含むクローン由来のゲノムDNAの10ngは、依然として陽性シグナルを得た（図3B、クローン5M3および6M1）。SBトランスポザーゼ発現ベクターの量が、三段減少を使用して連続して約10%まで減少された場合、メチル化トランスポゾンは、一貫して高い切り出し頻度を示した（データは示さず）。これは、SBトランスポザーゼの発現レベルが切り出し頻度の変化の原因であることを示唆する。この結果は、トランスポゾンの切り出し効率が、メチル化トランスポゾンにおいて少なくとも100倍より高いことを示す。この結果はまた、一過性にトランスフェクトしたメチル化トランスポゾンにおける、切り出し効率の約100倍の増加に一致する（図1B）。

このような結果から、トランスポゾンをコードする部分のメチル化によって、トランスポゾンの切り出し反応が促進されることが実証された。

（実施例4：トランスポゾンのゲノムへの挿入に及ぼすメチル化の効果）

この実施例では、本発明者らは、トランスポゾンのプラスミドDNAからゲノムへの挿入を検出を行った。プロモータートラップ型トランスポゾンを構築した。この構築方法を以下に簡便に示す。XhoI断片（pROSAβgeo由来）をEcoRI-BamHI断片（pTransCX-GFP）と置換する。

マウスゲノムの遺伝子内部にトラップ型トランスポゾンを入し、アミノ酸の読み枠が一致すれば β -geo (pROSA β geo (Genes & Development 5:1513-1523, 1991) が発現し、細胞が抗生物質 G418 (Geneticin, Invitrogen) に対して耐性となる仕組みを利用した。ここで使用したプラスミドの構造を図 4 A に示す。図 4 A における略号は、SA: スプライス・アクセプター、 β -geo: β -gal とネオマイシン耐性遺伝子との融合遺伝子

プロモータートラップ型トランスポゾン を S s s I C p G メチラーゼでメチル化し、SB 転移酵素とともにマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) (RIES 細胞、A, Nagy) に導入した。導入後、G418 によって 7 日間選択を行った。メタノール固定の後、ギムザ (Nakarai Tesque、熊本、日本) 染色した。

(プロモータートラップトランスポゾンの SB トランスポザラーゼ媒介挿入および Tc3 媒介挿入)

プロモータートラップトランスポゾンの SB トランスポザラーゼ媒介挿入について、 2.0×10^5 個の ES 細胞を、TransFast を使用して、 $0.4 \mu\text{g}$ の pBS10 と一緒に、 $1.6 \mu\text{g}$ のメチル化または非メチル化 pTransSA β -geo でトランスフェクトし、24 ウェルプレートの 1 ウェルに配置した。次いで、トランスフェクションの 48 時間後にトランスフェクトした細胞を 10 cm 培養皿に移し、1 ml あたり $150 \mu\text{g}$ の G418 で 7 日間選択した。この後、コロニーをギムザ染色し、計数した。いくつかの G418 耐性クローンを拡大させ、その DNA および RNA を抽出した。挿入部位の隣接する配列を、以前位記載されたように (Horie, K., A. Kuroiwa, M. Ikawa, M. Okabe, G. Kondoh, Y. Matsuda, および J. Takeda. 2001; Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 98:9191~9196)、ライゲーション媒介PCRに
 よって決定し、Ensemblマウスゲノムデータベース(version 1
 6.30.1)を使用して分析した。プロモータートラップ事象を、トランス
 ポゾン特異的プライマー β -geo (5'-TGCCAGTTTGAGGGG
 5 ACGACGACAGTATCG-3' (配列番号57)) ならびに各遺伝子
 に特異的なプライマー (5'-TGGAGTGAGCTAGAATCAGAA
 AGATGACAC-3' (M2S) (配列番号58)、5'-GACTTT
 CAAGACCTTCGACGCACCGTTCAC-3' (M2L) (配列
 番号59)、5'-TCTTCAGCCACAGGCTCCCAGACATG
 10 ACAG-3' (M4) (配列番号60) および5'-GATATGAAGA
 GCTGTCAGTTTGTAGCAGTC-3' (N1) (配列番号61))
 逆転写(RT)-PCRによって評価した。PCR産物を直接配列決定した。
 プロモータートラップトランスポゾンのTc3媒介挿入について、 2.0×10^5
 個のES細胞を、TransFastを使用して、 $1.0 \mu\text{g}$ のpRP23
 15 02 (Fischer, S. E., E. Wienholds, およびR. H.
 Plasterk. 2001; Proc. Natl. Acad. Sci. US
 A 98:6759~6764)、Tc3トランスポザーゼの発現ベクターと
 一緒に、 $1.0 \mu\text{g}$ のメチル化または非メチル化pTc3/SA β -geoで
 トランスフェクトし、24ウェルプレートの1ウェルに配置した。トランスフ
 20 ェクトした細胞を継代し、上述の条件下でG418で選択した。

その結果を図4Bに示す。シャーレ上の青色斑点の数から明らかなように、
 非メチル化トランスポゾンに比べて、メチル化トランスポゾンによって顕著に
 G418耐性コロニーが上昇していることが判明した。

図4Bは、SB転移に及ぼすCpGメチル化の影響を示す。3つの独立した

トランスフェクションに対し、培養皿あたりのG 4 1 8耐性コロニーの平均数を右に示す。エラーバーは、標準偏差を示す。示されるように、C p Gメチル化は、遺伝子の導入が顕著に上昇している。

図4 Cは、トラップした遺伝子の構造およびトランスポゾン挿入部位を示す。挿入部位を黒矢印で示す。クローンM 1 ~ M 4 は、メチル化トランスポゾンでのトランスフェクション由来であり、クローンN 1 ~ N 6 は、非メチル化トランスポゾン由来である。染色体の数、E n s e m b l 遺伝子デシグネーター、および遺伝子名もまた示す。2つの挿入部位（M 2 SおよびM 2 Lと示される）が特徴付けされたクローンM 2を除いて、各クローンにおいて1つの挿入部位を同定した。いくつかのクローン（M 2 S、M 2 L、M 4およびN 1）における正確なスプライシングは、上流のエキソン（白い矢印）およびトランスポゾンに対するプライマーを用いるR T - P C Rによって確認した。黒四角：エキソン。5キロベースのスケールバーを右に示す。

図4 Dは、T c転移に及ぼすメチル化の影響を示す。トラップベクターの構造を上部に示す。T I R：末端逆方向反復。3つの独立したトランスフェクションについて、ディッシュあたりのG 4 1 8耐性コロニーの平均数を底部に示す。

上記図4に示されるように、完全転移に及ぼすメチル化の影響が調べられた。上述のように、ゲノムの遺伝子座からのトランスポゾンの切り出し（転移反応の第1段階）は、C p Gのメチル化によって増強されることが示された。切り出されたトランスポゾンフラグメントは、ゲノムに再挿入され、転移反応を完了させる必要がある。本発明者らは、それゆえ、ゲノムに挿入されたトランスポゾンの数の点で、メチル化トランスポゾンと非メチル化トランスポゾンを比較した。C p Gのメチル化は、プロモーター活性を阻害するので、トランスポゾン内の選択マーカの発現カセットを利用して、ゲノム内への転移を検出し得る。その代わりに、本発明者らは、遺伝子トラップ型のトランスポゾンベク

ター (pTransSA β -geo) を構築し、遺伝子トラップ図式 (Friedrich, G., および P. Soriano. 1991; Genes Dev. 5: 1513~1523) を使用した。このベクターは、 β -geo の上流にスプライスアクセプター部位を含んだ (図 4 A)。このトランスポゾン
5 が活性遺伝子の中に挿入される場合、内因性遺伝子からなるキメラ融合転写物が生じることが考えられる。 β -geo がトラップされた遺伝子とインフレームである場合、細胞は、 β -geo の発現に起因して G418 に耐性となる (図 4 A)。メチル化または非メチル化トランスポゾンベクターを、SB トランス
10 ポゾンベクターとともに ES 細胞に導入し、G418 で選択した。メチル化トランスポゾンは 1, 600 コロニーを産生し、一方で、非メチル化トランスポゾンは 140 コロニーを得た (図 4 B)。この結果は、切り出しおよび挿入の両方を含む全転移の効率が、メチル化トランスポゾンにおいて 11 倍増強されることを示す。トランスポゾン挿入部位は、ライゲーション媒介 PCR によって決定され、遺伝子トラップ事象はランダムに選択されたクローンにおいて、
15 RT-PCR 分析によって評価され (図 4 C)、そして、得られた結果は、ベクターのメチル化が、遺伝子トラップ選択に影響しないことを示唆した。

異なるトランスポゾンシステムにおけるメチル化の影響を調べるために、本発明者らは、C. elegans 由来の Tc3 トランスポゾンを使用して、別の遺伝子トラップ型ベクター (pTc3/SA β -geo) を構築し (Fischer, S. E., H. G. van Luenen, および R. H. Plasterk. 1999. ; Mol. Gen. Genet. 262: 268~274. ; および Fischer, S. E., E. Wienholds, および R. H. Plasterk. 2001; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6759~6764)、そして、メチル化を有するかまたは有さないこのベクターを、Tc3 トランスポザン発現ベクターとともに ES
25 細胞に導入した。CpG のメチル化は、遺伝子トラップ事象を 2 倍増加させ

た（図4D）。この結果は、CpGのメチル化による転移の増強が他のトランスポゾンシステムにおいても見られるが、増強の程度は可変であることを示唆する。

- 5 従って、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇していることが実証された。

（実施例5：タンパク質の発現）

（タンパク質の発現およびEMSA）

- 10 IR/DR認識ドメインを含むN123ペプチドを、発現させ、以前に記載されたように（Ivics, Z., P. B. Hackett, R. H. Plasterk, およびZ. Izsvak. 1997; Cell 91:501~510）精製した。IR/DR-Lの外側結合部位に対応するオリゴヌクレオチドプローブについてのオリゴヌクレオチド配列は、非メチル化プローブについて、5'-TACAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACAC
15 TTAAG-3'（Unmet-U）（配列番号62）および5'-CTTAAGTGTATGTAACTTCCGACTTCAACTGTA-3'（Unmet-L）（配列番号63）であり、そして、メチル化プローブについて、5'-TACAGTTGAAGTOGGAAGTTTACATACACTTA
20 AG-3'（Met-U）（配列番号64）および5'-CTTAAGTGTATGTAACTTCCGACTTCAACTGTA-3'（Met-L）（配列番号65）であった（ここで、"O"は、5-メチルシトシンを表す）。このオリゴヌクレオチドは、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて[γ-³²P]ATPでまず標識化され、次いで、アニーリングされる。IR/DR-L
25 のDNAフラグメントをHindIIIおよびKpnIで消化することによって調製し、その後、SssIメチラーゼを用いてメチル化されるかまたはメチ

ル化されず、次いでこのフラグメントを、アルカリホスファターゼで処理した。
この消化したフラグメントを、フェノールクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、そして、最終的にT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて [γ - 32 P] ATPで標識化した。1. 0 μ gのポリ (d I - d C)、0. 2 p m o l
5 のオリゴヌクレオチドプローブまたは100 p gのIR/DR-Lフラグメント、および1. 0 μ lのN123の存在下で、以前に記載された (I v i c s, Z., P. B. H a c k e t t, R. H. P l a s t e r k, およびZ. I z s v a k. 1997; C e l l 91: 501~510) 緩衝液中に核タンパク質複合体を形成させた。25℃で30分間のインキュベーションの後、サンプルを、5%の天然ポリアクリルアミドゲルにロードし、150Vの定電圧で、
10 0. 5×T r i s -ホウ酸-EDTA中、オリゴヌクレオチドプローブについて1. 5時間、IR/DR-Lフラグメントについて2. 5時間電気泳動した。ゲルが乾燥した後、核タンパク質複合体をオートラジオグラフィーにて可視化した。

15 (ChIPアッセイ)

製造業者のプロトコルに従って、ChIPアッセイキット (U p s t a t e) を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。この研究において使用された抗体は、抗アセチル H3 (U p s t a t e) および抗トリメチル化H3K9 (A b c a m) であった。沈降したDNAを、複数の遺伝子座において、
20 アミラーゼ2. 1遺伝子について、プライマー5' -CCTTGTTACGGGTTGGTGGAGGTCAC-3' (配列番号66) および5' -CGCCACTCGAACAGGTGGACAATAG-3' (配列番号67)、 β -小グロビン遺伝子について、5' -TGCGAGGATAAGAACAGACACTAC-3' (配列番号68) および5' -ACAGACTCAGAAG
25 CAAACGTAAGA-3' (配列番号69) ; EGFP遺伝子について、EGFP-1UおよびEGFP-1L、IR/DR-Lについて、5' -GC

ACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTC-3' (配列番号70) およ
 び5'-CTTCTAAAGCCATGACATCATTTTCTG-3' (配
 列番号71)、ならびにIR/DR-Rについて、5'-GAAGGCTAC
 TCGAAATGTTTGACCCAAG-3' (配列番号72) および5'

5 -CAAGCGCGCAATTAAACCCTCACTAAAGG-3' (配列
 番号9) を用いるPCRによって分析した。PCR条件は、HotStarT
 aqを用いて、95℃で15分間、これに続いて、94℃で30秒間、60℃
 で30秒間および72℃で1分間の35サイクル、その後の、72℃で7分間
 の最終伸長からなる。半定量的な分析を可能にするため、1反応あたり1、0、
 10 2、0.04および0.008 μ lで投入DNAを使用し、1反応あたり1お
 よび0.2 μ lで沈降したDNAを使用した。ただし、抗トリメチル化H3K
 9の画分中のEGFP、IR/DR-LおよびIR/DR-Rについては、1
 反応あたり5および1 μ lの量を使用した。

15 図6は、裸のメチル化IR/DRに対するSBトランスポザラーゼDNA結合
 ドメインの不変の親和性を示す。

図6Aは、IR/DRにおけるCpG部位およびトランスポザラーゼ結合部位
 の模式図。黒丸：CpG部位。

図6B～Eは、組換えSBトランスポザラーゼペプチド(N123)での電気
 20 泳動移動度シフトアッセイ(Electrophoretic Mobility Shift Assay =
 EMSA)を示す。

図6BおよびCは、IR/DR-Lの34bpの外側結合部位で得られた結
 果であり、図6DおよびEは、300bpのIR/DR-Lフラグメントで得
 られた結果である。

25 図6Bに示すように、非メチル化またはメチル化外側結合部位を増大する濃
 度のN123ペプチド(1600～100倍希釈の精製ペプチド)と混合し、

核タンパク質複合体を形成した。

図 6 C に示すように、非メチル化外側結合部位をプローブとして標識化し、非メチル化外側結合部位またはメチル化外側結合部位を、増大する濃度で（1 ～ 50 倍のモル過剰のプローブ）競合物質として使用した。

- 5 図 6 D に示すように、非メチル化 I R / D R - L フラグメントまたはメチル化 I R / D R - L フラグメントを、核タンパク質複合体の形成のために、増大する濃度の N 1 2 3 ペプチド（5 1 0 0 ～ 1 6 0 倍希釈の精製ペプチド）と混合した。

- 図 6 E に示すように、非メチル化 I R / D R - L フラグメントをプローブとして標識化し、非メチル化またはメチル化未表しいの I R / D R - L フラグメントを、増大する濃度（5 0 0 ～ 8 0 0 0 倍モル過剰のプローブ）で、競合物質として使用した。U n m e t : 非メチル化、M e t : メチル化、F : 遊離プローブ、C : 複合体。複合体 1 (C 1) および C 2 は、それぞれ、I R / D R あたりの N 1 2 3 ペプチドの 1 および 2 分子の結合を示す (I v i c s , Z . ,
10 P . B . H a c k e t t , R . H . P l a s t e r k , および Z . I z s v a k . 1 9 9 7 ; C e l l 9 1 : 5 0 1 ～ 5 1 0) 。

図 7 は、所定の遺伝子座でのメチル化トランスポゾンまたは非メチル化トランスポゾンの C h I P アッセイを示す。

- 図 7 A は、C h I P アッセイにおいて分析された S B トランスポゾン領域。
20 P C R 増幅領域を各成分の下の薄い線として示す。黒三角 : 1 0 x 5 1 1 部位。

- 図 7 B および C は、沈降した DNA の P C R 分析。図 3 および 4 に示すように、クローン 5 M 3 および 5 U 3 (B) ならびにクローン 6 M 1 1 および 6 U 1 (C) を、それぞれ、親クローン R L 5 および R L 6 から誘導した。投入および沈降した DNA の 5 倍段階希釈を分析した。A c H 3 : 抗アセチル H 3 、
25 M e H 3 K 9 : 抗トリメチル化 H 3 K 9 、 n o A b : 抗体を含まないコントロール。アミラーゼ 2 . 1 および β - 小グロビンを、異色領域かつ真性染色質

領域に対する代表的なコントロールとして使用した。アミラーゼ 2. 1 および β -小グロビンのバンドの強度は 5 M3 の抗アセチル H 3 画分において同じであるが、投入 DNA におけるアミラーゼ 2. 1 配列のより高い増幅効率は、 β -小グロビン配列が、この画分においてアミラーゼ 2. 1 配列と比較して富化
5 されることを示す。抗体を含まないコントロールのレーンに見られるかすかなバンドは、タンパク質に対するゲノム DNA の非特異的な結合由来である。アガロースビーズを調製に使用した。定量は 2 回行い、代表的な結果を示す。

図 6 および 7 に示されるように、裸のメチル化 IR/DR に対する SB トラ
10 ンスポザーゼ DNA 結合ドメインの不変の親和性が本発明によって示された。

CpG のメチル化による増強された転移の機構を解明するために、本発明者らは、EMSA によるメチル化 IR/DR と非メチル化 IR/DR に対する組換え SB トランスポザーゼペプチドの親和性を比較した。右と左の IR/DR の両方は、SB トランスポザーゼに対する 2 つの結合部位を有する (図 6 A)。
15 外側の結合部位のみが CpG 配列を含む (図 6 A) ので、左概則の結合部位は、プローブおよび競合物質として使用した。IR/DR 認識ドメインを含むことが以前に報告された (I v i c s, Z., P. B. H a c k e t t, R. H. P l a s t e r k, および Z. I z s v a k. 1997; C e l l 91: 501~510) SB トランスポザーゼの最初の 123 アミノ酸 (N123) が、
20 *E s c h e r i c h i a c o l i* 中に発現し、C 末端のヒスチジンタグを介して精製し、そして、核タンパク質複合体を作製するのに使用した。非メチル化またはメチル化結合配列がプローブとして使用された場合、シフトしたバンドの強度は、匹敵した (図 6 B)。非メチル化部位またはメチル化部位が、
25 標識化した非メチル化プローブに対する競合物質として使用された場合、差異は観察されなかった (図 6 C)。プローブおよび競合物質として左側の IR/DR フラグメントの全領域を使用して同じ実験を行い、メチル化の作用は観察

されなかった（図6DおよびE）。これらの結果は、IR/DRのCpGメチル化が、裸のIR/DRに対するN123ペプチドの直接結合を変化しないことを示し、トランスポゾン領域でネイティブのクロマチン構造が転移の増強を理解するとみなされることが必要であり得ることを示唆する。

5

図7に示されるように、メチル化トランスポゾンおよび非メチル化トランスポゾンでのクロマチン構造が確認された。

DNA組換え反応は、DNA基質の高次構造上の変化によって影響され得る。例えば、E. coliタンパク質HUは、トランスポザゼ結合部位と結合
10 することによってバクテリオファージMuにおける組換え効率を刺激する²³。SB転移に関して高移動度群B1（HMG B1）タンパク質の同様の作用が、最近報告された⁴²。本発明者らは、それゆえ、ChIPアッセイを使用して、ME L細胞クローンにおけるメチル化トランスポゾンおよび非メチル化トランス
15 スポゾンでのクロマチン構造を調べた。ヒストンテイルの改変がより高い階級のクロマチン構造の機構および遺伝子発現の調節において重大な役割を果たすことが示された。最近の研究は、アセチル化ヒストンH3が真性染色質に配置され、ここで、DNAが大まかにパッケージングされ、そして、リジン9残基（H3K9）でメチル化ヒストンH3がヘテロクロマチン上に配置され、こ
20 25 20 C. Elgin, 2002; Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 178~187）。本発明者らは、それゆえ、ChIPアッセイにアセチルH3またはトリメチル化H3K9を認識する抗体を使用し、2つの異なる遺伝子座のメチル化トランスポゾン領域と非メチル化トランスポゾン領域のクロマチン構造を、RL5由来クローンおよびRL6由来クローンをを用いて比較した（図7）。ChIPアッセイに対しての内部標準として、腓膵アミラーゼ2.1遺伝子を異色マーカーとして使用し、 β -小グロビン遺伝子を真性染色質マーカー

一として使用した (Dhar, V., A. I. Skoultschi, および C. L. Schildkraut. 1989.; Mol. Cell. Biol. 9: 3524~3532; および Schubeler, D., C. Francastel, D. M. Cimbora, A. Reik, D. I. Martin, および M. Groudine. 2000; Genes Dev. 14: 940~950)。図7に示すように、アセチルH3について富化したものに比例して、トリメチル化H3K9について富化した画分におけるアミラーゼ2.1遺伝子の量は、 β -小グロビン遺伝子の量よりも有意に高く、アミラーゼ2.1遺伝子と β -小グロビン遺伝子が、それぞれヘテロクロマチンと真性染色質に位置するという予想に一致する。アセチルH3の画分におけるトランスポゾン配列 (IR/DR-R、EGFPおよびIR/DR-L) の富化は、非メチル化トランスポゾンを含むクローン (5U3および6U1) において観察された。対照的に、トリメチル化H3K9の画分における富化は、メチル化トランスポゾンを含むクローン (5M3および6M1) において観察された。この富化は、GFPレポーターの発現パターンと密接に関係した (図3D)。これらの結果は、メチル化トランスポゾン領域および非メチル化トランスポゾン領域がそれぞれ、ヘテロクロマチンおよび真性染色質を形成したことを示す。

このように、タンパク質発現レベルでも、トランスポゾンの転移効率が上昇していたことが明らかになった。また、そのメカニズムが明らかになった。

(実施例6：トランスジェニックマウスの作製)

実施例4に示されるような系を用いて、トランスジェニックマウスを作製した。手短に述べると、実施例4で得たES細胞を胚盤胞に打ち込み、それを偽妊娠マウスの子宮に戻してマウスを誕生させた。このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇させることが実証

された。

(実施例 7 : 天然における例)

次に、メチル化がトランスジェニック生物の生産に有用であることを実証した。手短に述べると、メチル化されているトランスポゾンDNAとトランス
5 ポザーゼRNAを同時に受精卵に打ち込むことによってマウスを作製した。このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇させることが実証された。

10 (実施例 8 : 別のトランスポゾンでの例)

次に、実施例 1 において使用したSB系の代わりにTc1/marinerの一つとして、Tc1 (アクセッション番号X01005) を用いて、実施例 1 ~ 3 と同様の実験を行った。このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの
挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇させることが実証された。

15

(実施例 9 : 別のトランスポゾンでの例)

次に、実施例 1 において使用したSB系の代わりにminos-2 (アクセ
ッション番号Z29098) を用いて実施例 1 ~ 3 と同様の実験を行った。こ
のマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕
20 著に上昇させることが実証された。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、
本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであること
が理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その
25 内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書
に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

本発明を用いれば、トランスジェニック生物（特に、哺乳動物のような脊椎動物）を効率よく作製することができるようになった。このような生物は、モ

- 5 デル動物、スクリーニング、薬理試験などで非常に有用である。

請求の範囲

1. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、
5 単離された核酸分子。
2. さらに、所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
3. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
- 10 4. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項1に記載の単離された核酸分子。
5. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
- 15 6. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求項1に記載の単離された核酸分子。
7. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項2に記載の単離された核酸分子。
- 20 8. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項1に記載の単離された核酸分子。
9. 前記宿主は、真核生物を含む、請求項8に記載の単離された核酸分子。
10. 前記宿主は、哺乳動物を含む、請求項8に記載の単離された核酸分子。
11. 前記宿主は、げっ歯類を含む、請求項8に記載の単離された核酸分子。
12. 前記核酸分子が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザアーゼ
25 が作用する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
13. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する遺伝子カセットであつ

て、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、遺伝子カセット。

14. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有するベクターであって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、ベクター。

15. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項14に記載のベクター。

16. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項14に記載のベクター。

17. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項14に記載のベクター。

18. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求項14に記載のベクター。

19. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項14に記載のベクター。

20. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項14に記載のベクター。

21. 前記細胞は、真核生物細胞を含む、請求項20に記載のベクター。

22. 前記細胞は、哺乳動物細胞を含む、請求項20に記載のベクター。

23. 前記細胞は、げっ歯類細胞を含む、請求項20に記載のベクター。

24. 前記核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザラーゼが作用する、請求項14に記載のベクター。

25. ゲノム上に挿入される外来核酸分子に対してトランスポザラーゼを作用させるための組成物であって、該組成物は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および該外来核酸分子を含み、該トランスポゾンにコードする配列はメチル化されている、組成物。

26. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む細胞であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、細胞。

27. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、
5 請求項26に記載の細胞。

28. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項26に記載の細胞。

29. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項26に記載の細胞。

30. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求
10 項26に記載の細胞。

31. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項26に記載の細胞。

32. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項26に記載
15 の細胞。

33. 前記細胞は、真核生物細胞を含む、請求項26に記載の細胞。

34. 前記細胞は、哺乳動物細胞を含む、請求項26に記載の細胞。

35. 前記細胞は、げっ歯類細胞を含む、請求項26に記載の細胞。

36. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコード
20 する核酸配列を有する核酸分子を含む組織であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、組織。

37. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項36に記載の組織。

38. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項36に記載の組織。

39. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項3
25 6に記載の組織。

40. 前記トランスポゾンにはSleeping Beautyを含む、請求項36に記載の組織。

41. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項36に記載の組織。

42. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項36に記載の組織。

43. 前記組織は、真核生物組織を含む、請求項42に記載の組織。

44. 前記組織は、哺乳動物組織を含む、請求項42に記載の組織。

10 45. 前記組織は、げっ歯類組織を含む、請求項42に記載の組織。

46. トランスポゾンをコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む生物であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、生物。

47. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項46に記載の生物。

48. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項46に記載の生物。

49. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項46に記載の生物。

50. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求項46に記載の生物。

51. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結される、請求項46に記載の生物。

52. 前記生物は、真核生物を含む、請求項46に記載の生物。

53. 前記生物は、哺乳動物を含む、請求項46に記載の生物。

25 54. 前記生物は、げっ歯類を含む、請求項46に記載の生物。

55. 前記所望の遺伝子は、前記生物に由来しない、請求項46に記載の生

物。

56. トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を提供する工程；

5 B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；

C. 該生殖細胞において該トランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択する工程；

D. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する、方法。

10 57. 前記生物は、真核生物を含む、請求項56に記載の方法。

58. 前記生物は、哺乳動物を含む、請求項56に記載の方法。

59. トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、

15 単離された核酸分子を提供する工程；

B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；ならびに

C. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する、方法。

60. 前記生物は、真核生物を含む、請求項59に記載の方法。

20 61. 前記生物は、哺乳動物を含む、請求項59に記載の方法。。

62. 前記生物は、げっ歯類を含む、請求項59に記載の方法。

63. トランスジェニック生物を作製するためのキットであって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、

25 単離された核酸分子；

B. トランスポザーゼ、を包含する、キット。

64. さらに、前記核酸分子およびトランスポザーゼの使用法を記載する説明書を含む、請求項63に記載のキット。

5 65. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つのヌクレオチドがメチル化されている、単離された核酸分子の、トランスジェニック生物の作製のための使用。

66. 少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント。

10 67. 前記核酸配列は、外来遺伝子の少なくとも一部を含む、請求項66に記載の核酸フラグメント。

68. 前記核酸配列は、少なくとも一つの発現制御領域を含む、請求項66に記載の核酸フラグメント。

15 69. 前記発現制御領域は、プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサーからなる群より選択される、請求項68に記載のフラグメント。

70. 外来遺伝子の少なくとも一部をさらに含み、前記核酸配列は、該外来遺伝子の少なくとも一部をコードする配列と作動可能に連結される、請求項66に記載の核酸フラグメント。

71. 前記細胞は、動物由来である、請求項66に記載の核酸フラグメント。

20 72. 前記細胞が脊椎動物から得られたものである、請求項71に記載の核酸フラグメント。

73. 前記脊椎動物は、哺乳動物である、請求項72に記載の核酸フラグメント。

25 74. 前記哺乳動物は、霊長類またはげっ歯類である、請求項73に記載の核酸フラグメント。

75. 前記細胞のDNAは、細胞ゲノム、エピソームおよびプラスミドから

なる群より選択される、請求項 66 に記載される核酸フラグメント。

76. 前記少なくとも 1 つの逆方向反復配列は、配列番号 20 もしくは 21、またはその一部を含む、請求項 66 に記載の核酸フラグメント。

77. 前記トランスポザーゼは、SBタンパク質である、請求項 66 に記載
5 の核酸フラグメント。

78. 前記トランスポザーゼは、配列番号 3 に対して少なくとも 80% のアミノ酸相同性を有する、請求項 77 に記載の核酸フラグメント。

79. 前記少なくとも 1 つの逆方向反復配列が少なくとも 1 つの直列反復配列を含み、該直列反復配列は、配列番号 26 に記載される塩基配列または該塩
10 基配列に対して少なくとも 80% 相同な塩基配列を含む、請求項 66 に記載の核酸フラグメント。

80. 前記少なくとも 1 つの逆方向反復配列が少なくとも 1 つの直列反復配列を含み、該直列反復配列は、配列番号 22 ~ 25 に記載される核酸配列からなる群より選択される、請求項 66 に記載の核酸フラグメント。

15 81. 細胞中の DNA に別の DNA を導入するための核酸導入システムであって、該システムは：

A) 少なくとも 2 つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内の DNA に組込まれることができる、
20 少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント；および

B) トランスポザーゼまたはトランスポザーゼをコードする核酸、
...を含む、核酸導入システム。

82. 前記トランスポザーゼは、SBタンパク質である、請求項 81 に記載の核酸導入システム。

25 83. 前記トランスポザーゼは、配列番号 3 に記載されるアミノ酸配列またはその改変体を有するか、または前記トランスポザーゼをコードする核酸配列

は、配列番号 2 に記載される核酸配列またはその改変体を有する、請求項 8 1 に記載の核酸導入システム。

8 4. 前記トランスポザーゼをコードする核酸は、細胞ゲノムに組み込まれる、請求項 8 1 に記載の核酸導入システム。

5 8 5. プラスミドまたはウイルスベクターをさらに含み、該プラスミドまたはウイルスベクターは、前記核酸フラグメントをその一部として含む、請求項 8 1 に記載の核酸導入システム。

8 6. 前記核酸フラグメントは、外来遺伝子をコードする配列の少なくとも一部を含む、請求項 8 1 に記載の核酸導入システム。

10 8 7. 前記核酸フラグメントは、前記細胞の中に、粒子ボンバードメント；エレクトロポレーション；マイクロインジェクション；遺伝子導入試薬の利用；およびウイルスベクターの利用からなる群より選択される方法を用いて導入される、請求項 8 1 に記載の核酸導入システム。

8 8. トランスジェニック生物を生産するための方法であって、

15 核酸フラグメントおよびトランスポザーゼを多能性細胞に導入する工程であって、該核酸フラグメントは、少なくとも 2 つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内の DNA に組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメントである、工程；

20

該細胞を生物体へと成長させる工程；

を包含する、方法。

8 9. 前記多能性細胞は、卵母細胞、胚細胞、卵および幹細胞からなる群より選択される、請求項 8 8 に記載の方法。

25 9 0. 前記生物は、げっ歯類または霊長類である、請求項 8 8 に記載の方法。

9 1. 前記生物は、マウスまたはラットである、請求項 8 9 に記載の方法。

9 2. 核酸を細胞中のDNAに導入するための方法であって、

核酸フラグメントを細胞に導入する工程であって、該核酸フラグメントは、
少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメン
5 ントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、
該核酸フラグメントは、該トランスポザーゼの存在下で細胞内のDNAに組込
まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フ
ラグメントである、工程、
を包含する、方法。

9 3. さらに、トランスポザーゼを前記細胞中に導入する工程を包含する、
10 請求項9 2に記載の方法。

9 4. 前記トランスポザーゼは、配列番号3と少なくとも80%の相同性を
有する、請求項9 2に記載の方法。

9 5. 前記細胞は、前記トランスポザーゼをコードする核酸を含む、請求項
9 2に記載の方法。

15 9 6. 前記トランスポザーゼをコードする核酸は、細胞ゲノムに組み込まれ
る、請求項9 5に記載の方法。

9 7. 前記トランスポザーゼは、細胞中で安定に発現される、請求項9 5に
記載の方法。

9 8. 前記トランスポザーゼは、誘導性プロモーターに制御下にあるように
20 作動可能に連結される、請求項9 5記載の方法。

9 9. 前記核酸配列は、タンパク質をコードする、請求項9 2に記載の方法。

1 0 0. 前記核酸配列は、マーカートンパク質をコードする、請求項9 2に
記載の方法。

1 0 1. 細胞内の核酸配列を移動させるための方法であって：

25 少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラ
グメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を

有し、該核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント、を含む細胞の中に、トランスポザーゼを導入する工程、

を包含し、該トランスポザーゼは、該細胞のDNA中の第一の位置から該DNAの第二の位置に該核酸配列を移動させる、
5 方法。

102. 前記細胞のDNAは、ゲノムDNAである、請求項101に記載の方法。

103. 前記第一の位置は、染色体外DNAである、請求項101に記載の方法。
10

104. 前記第二の位置は、染色体外DNAである、請求項101に記載の方法。

105. 前記トランスポザーゼは、前記細胞中に核酸として導入する、請求項101に記載の方法。

15 106. 細胞内の遺伝子を同定するための方法であって：

少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含む核酸フラグメントであって、該逆方向反復配列は、トランスポザーゼに結合する能力を有し、該核酸フラグメントは、細胞内のDNAに組込まれることができる、少なくとも一つのヌクレオチドがメチル化された核酸フラグメント、およびトランスポザーゼを、細胞の中に導入する工程；
20

該細胞中のDNAを、該核酸配列を切断することができる制限エンドヌクレアーゼで消化する工程；

該逆方向反復配列を同定する工程；

該逆方向反復配列に近い核酸の配列を決定する工程；および

25 該配列と配列情報データベース内の配列情報と比較する工程、
を包含する、方法。

図1A

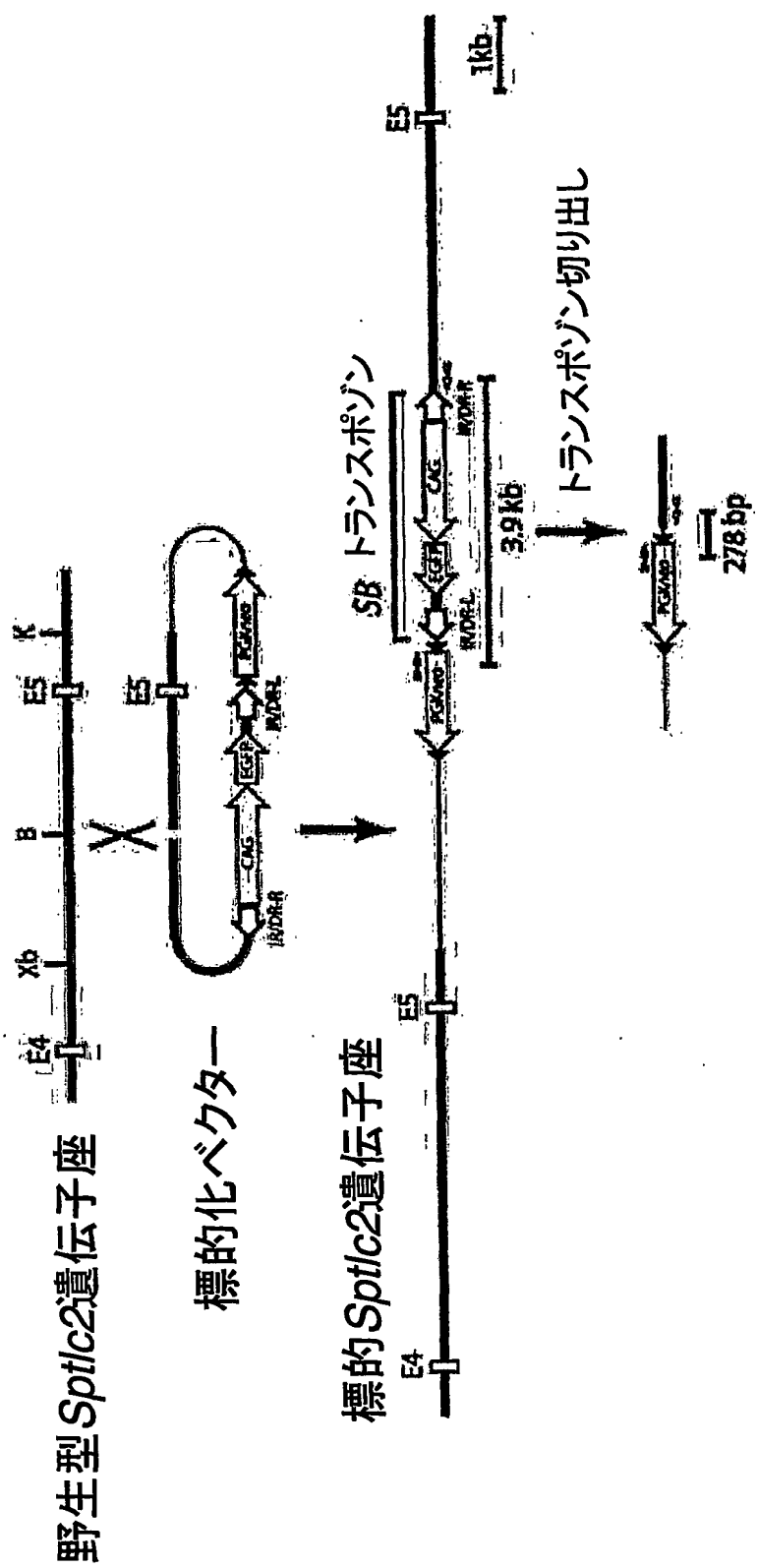


図1B

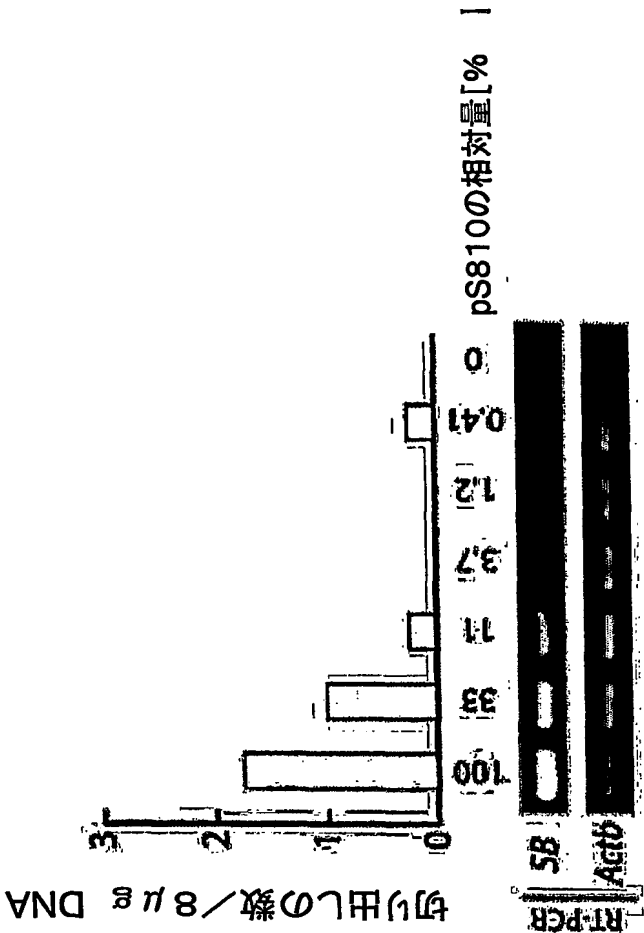
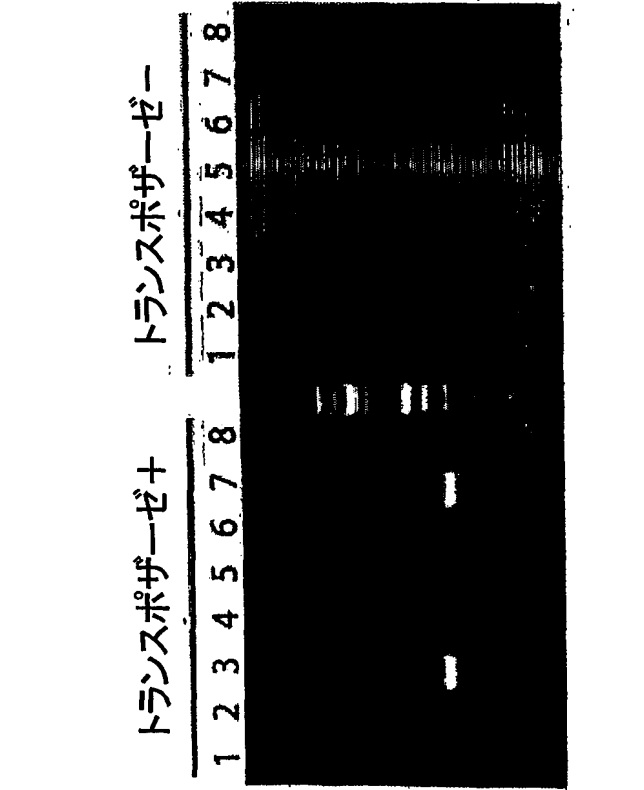


図1C

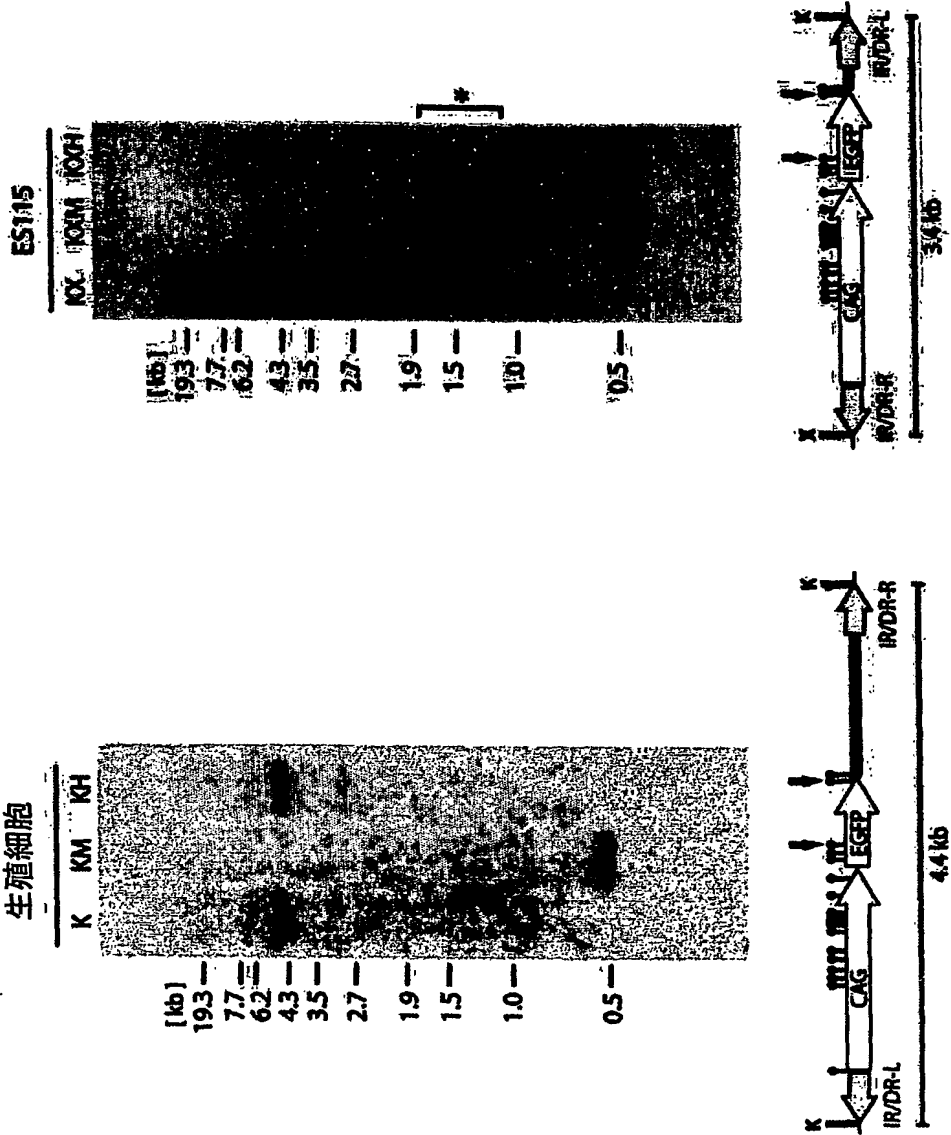


図1D

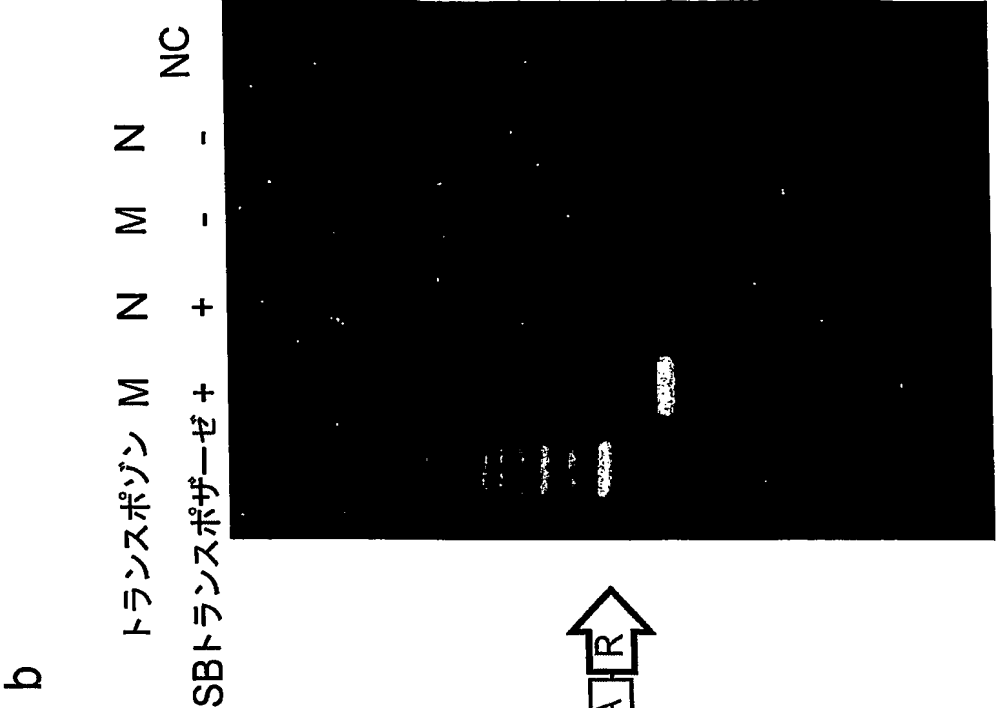
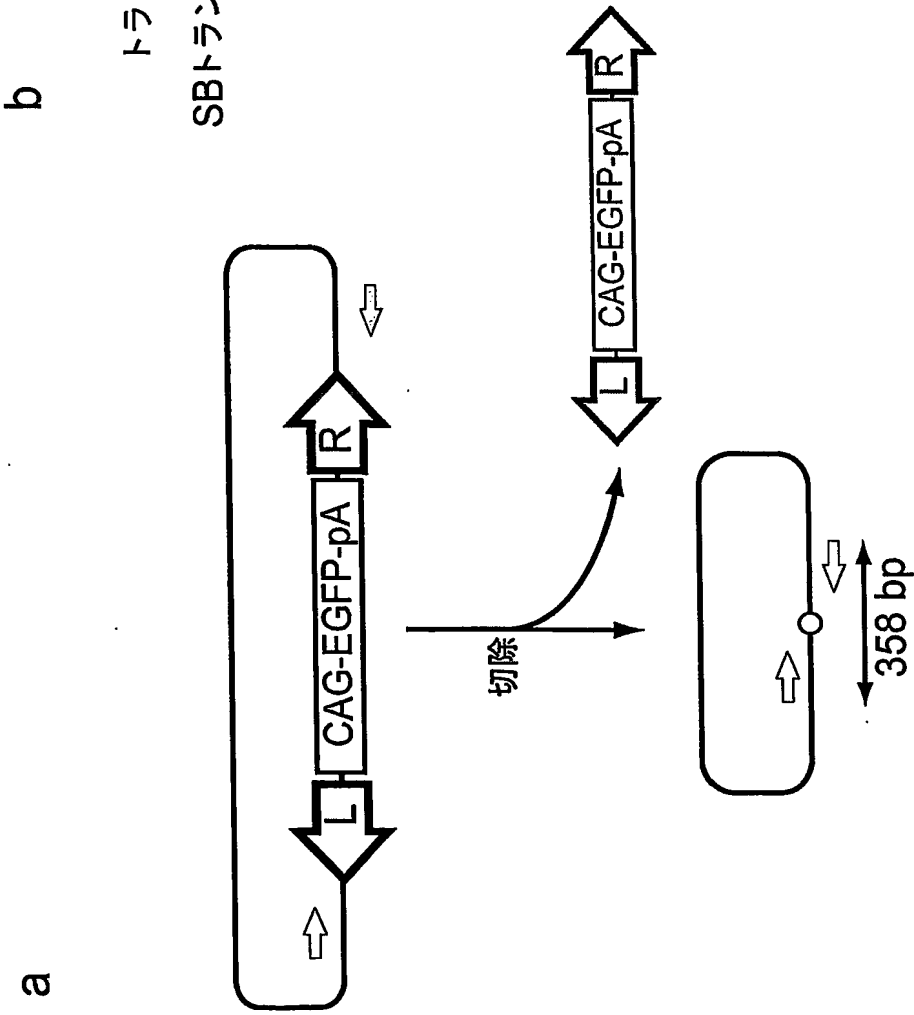
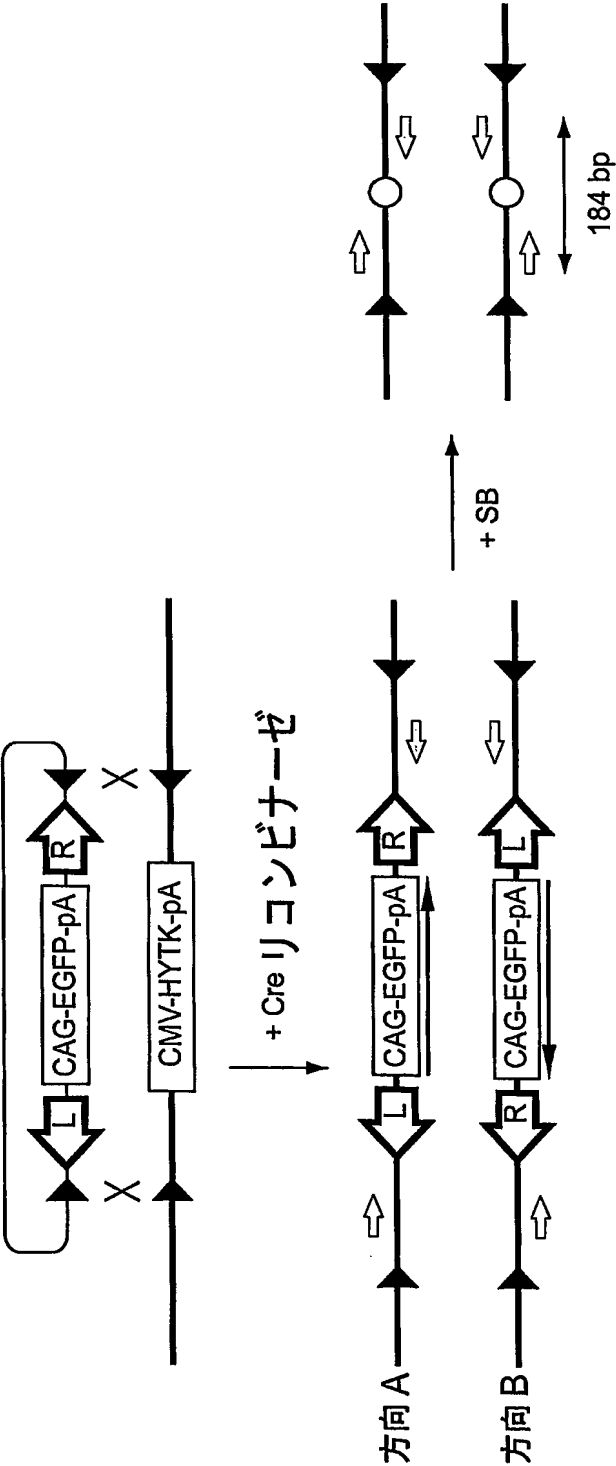


図2A



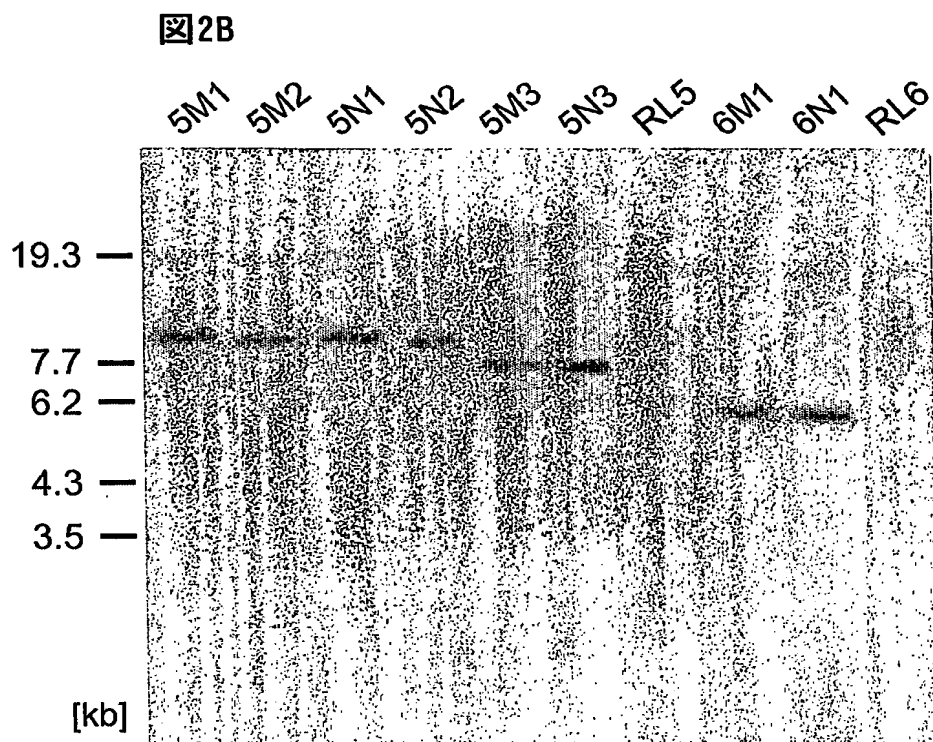
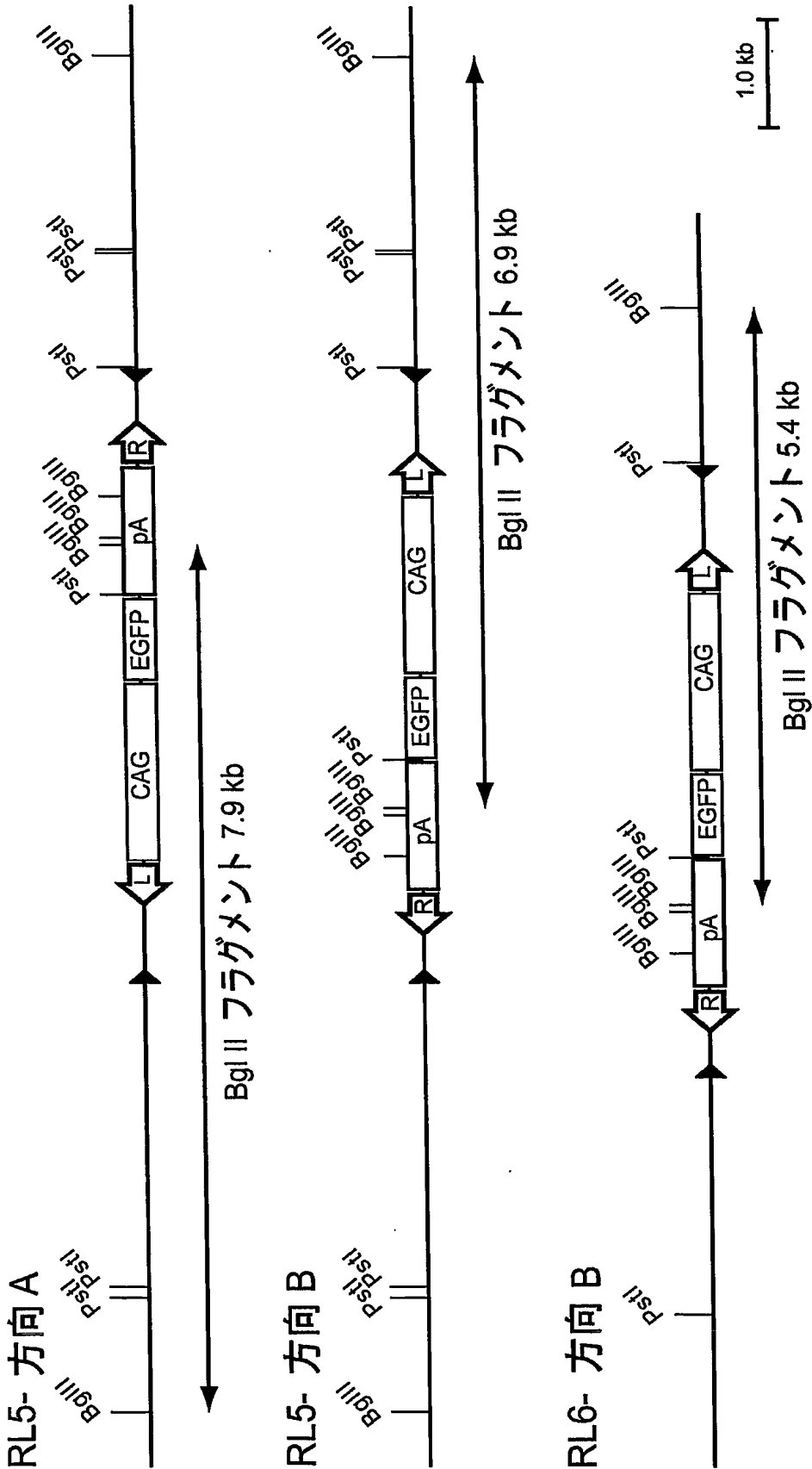


図2C



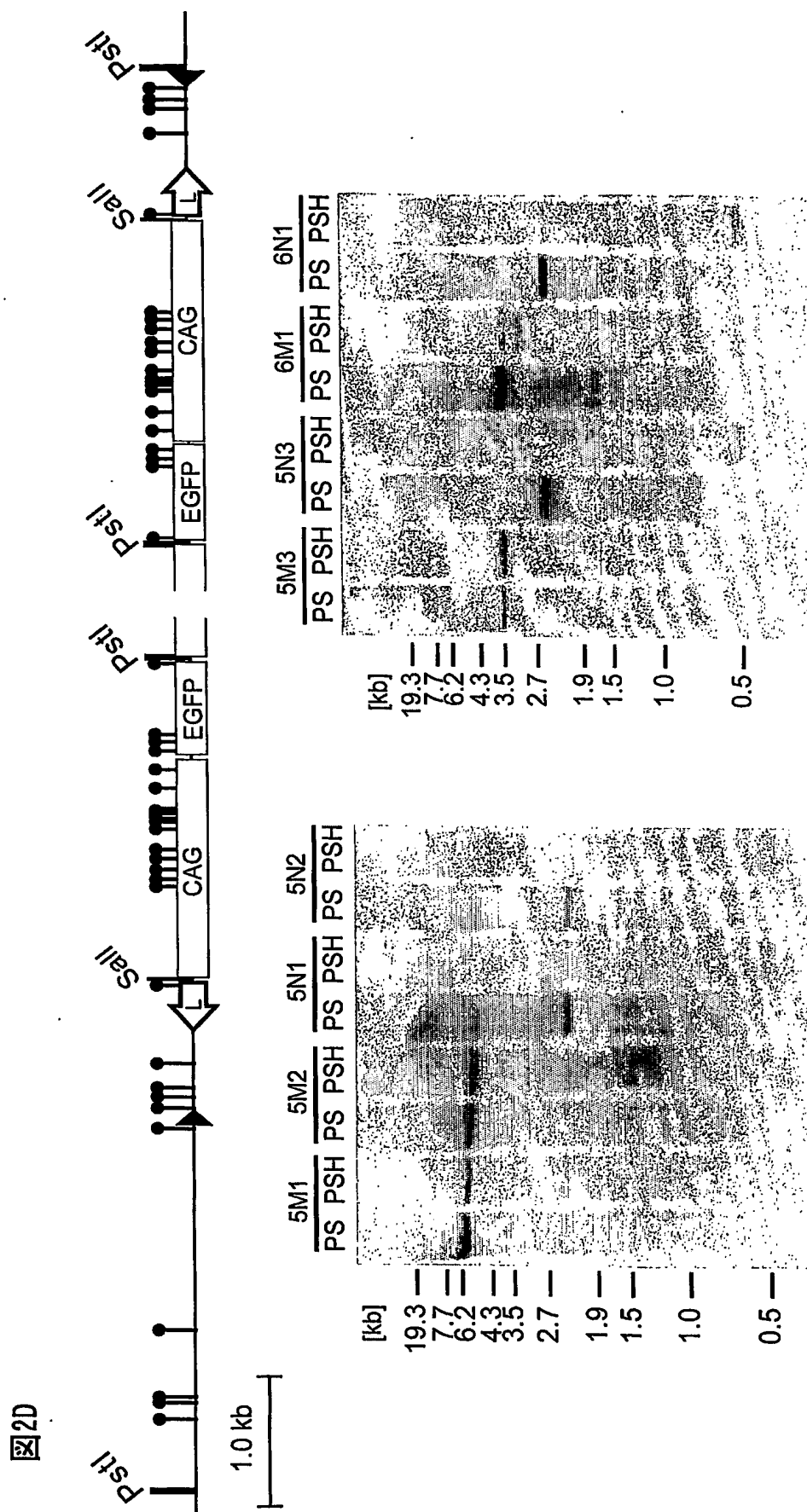


図2E

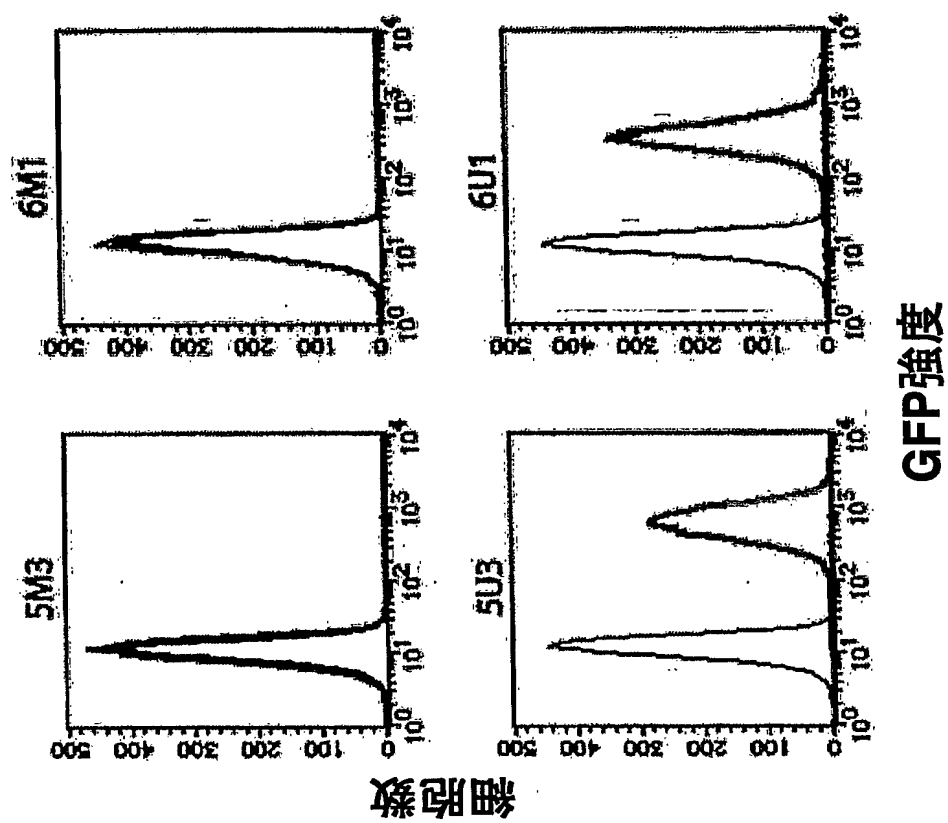


図3A

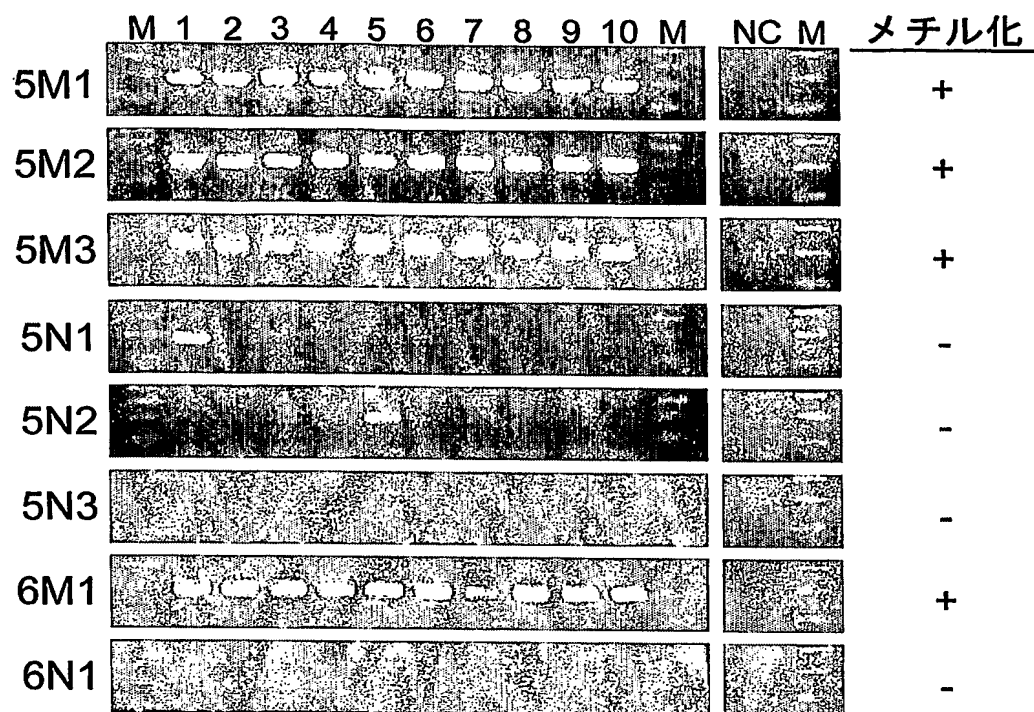


図3B

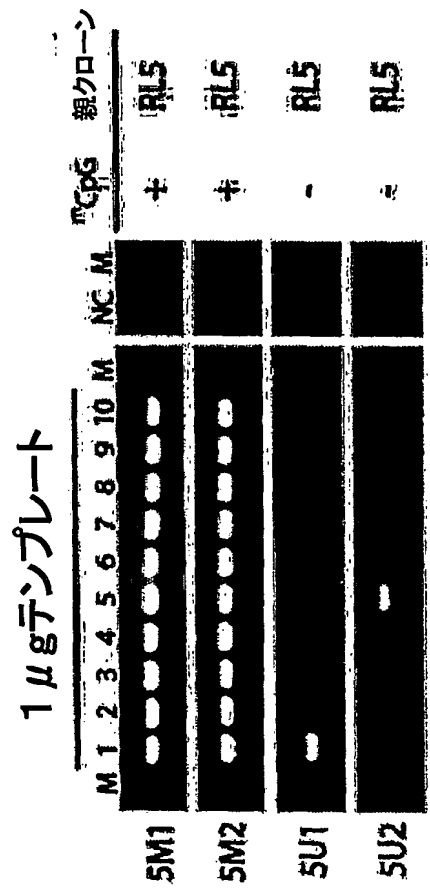
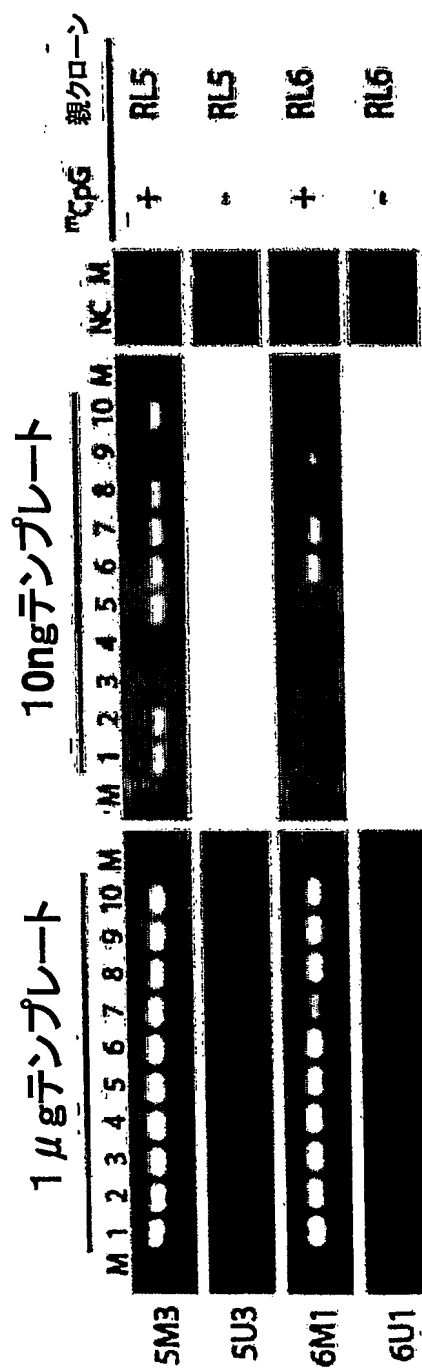


図3C



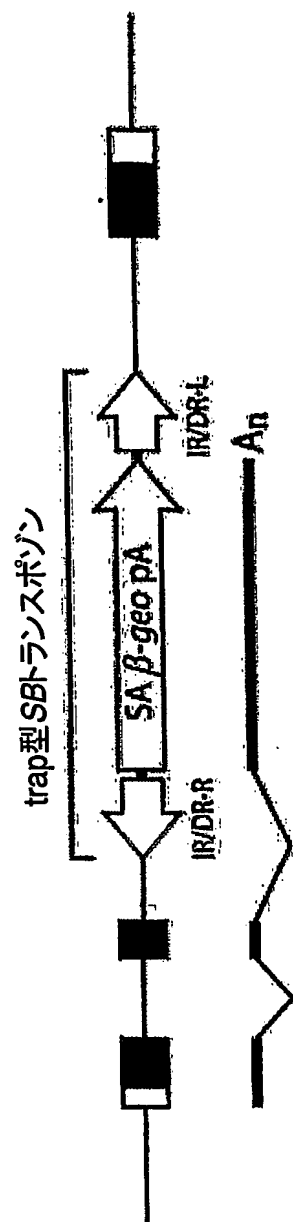


図4B

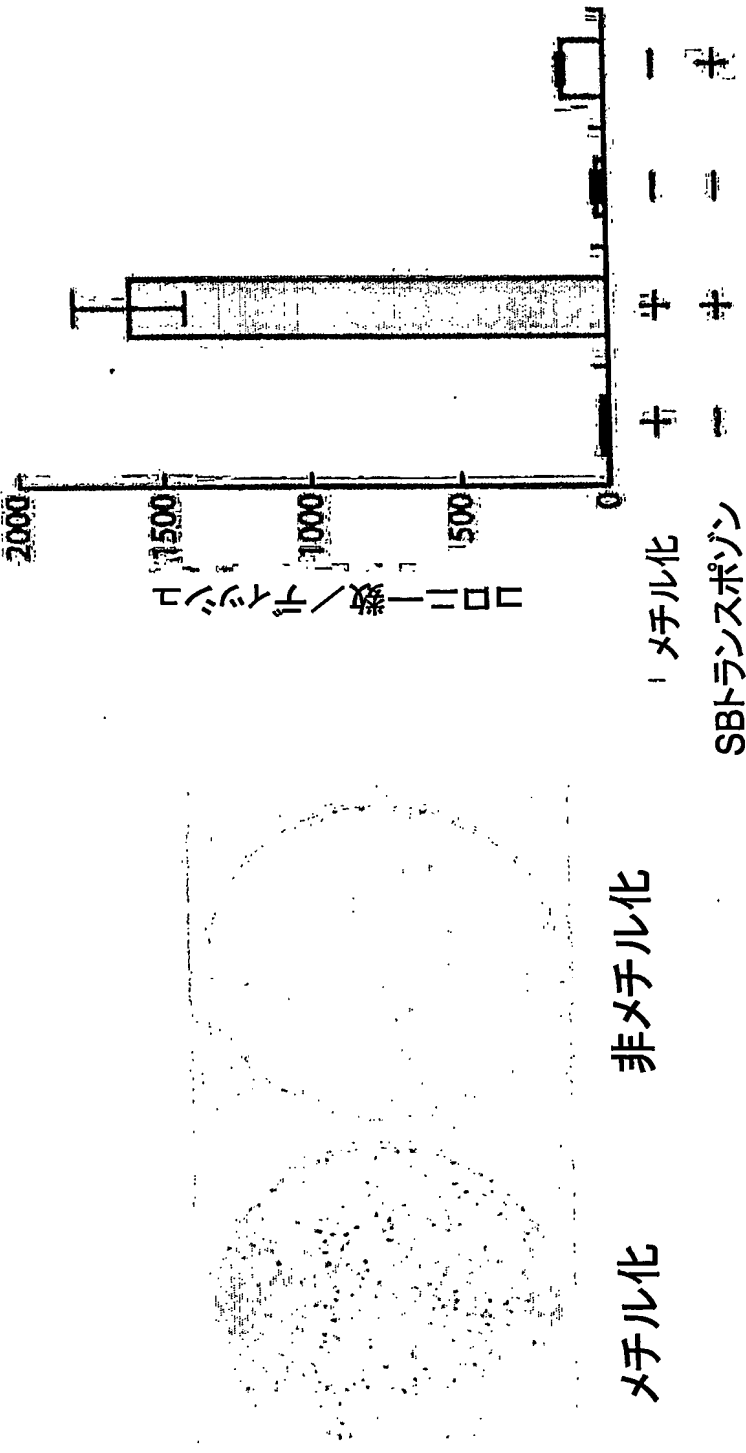


図4C

M1: Chr. 10, NM_172508



M2S: Chr. 7, ENSMUST49387



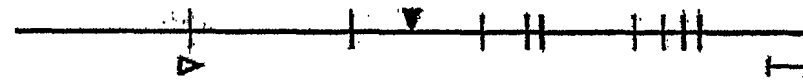
M2L: Chr. 8, ENSMUSESTT33450



M3: Chr. 16, ENSMUSESTT27446



M4: Chr. 19, Pten



N1: Chr. 1, ENSMUST27914



N6: Chr. 16, ENSMUSESTT26711



図4D

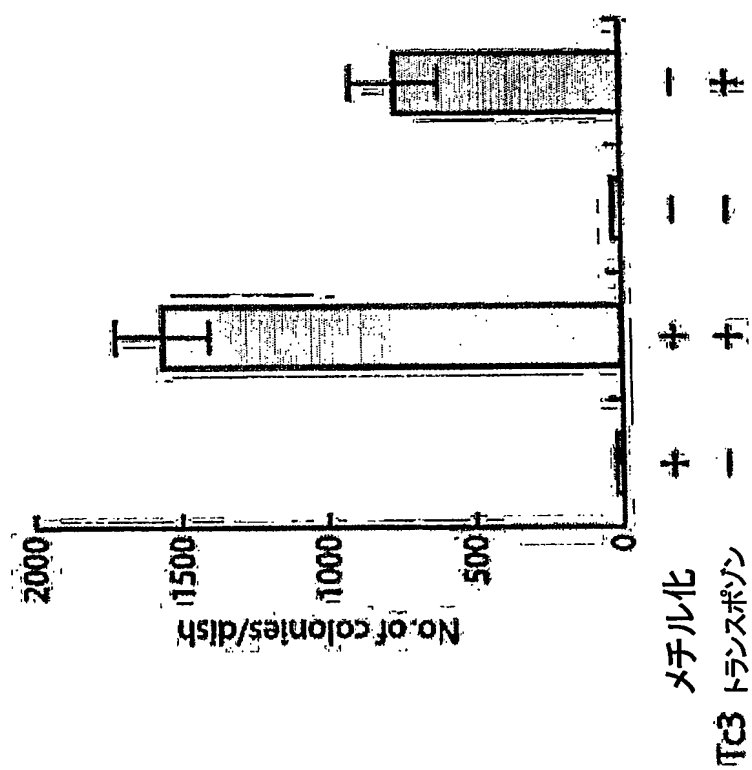


図5A

CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments

```

Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1: X01005      1610 bp
Sequence 2: Z29098      1773 bp
Sequence 3: Z29102      1717 bp
Sequence 4: U11641      1263 bp
Sequence 5: U11652      1296 bp
Sequence 6: L48685      1455 bp
Start of Pairwise alignments
Aligning...
Sequences (5:6) Aligned. Score: 3
Sequences (3:4) Aligned. Score: 3
Sequences (1:2) Aligned. Score: 9
Sequences (3:5) Aligned. Score: 3
Sequences (4:5) Aligned. Score: 95
Sequences (1:3) Aligned. Score: 9
Sequences (3:6) Aligned. Score: 10
Sequences (4:6) Aligned. Score: 3
Sequences (1:4) Aligned. Score: 1
Sequences (2:3) Aligned. Score: 99
Sequences (1:5) Aligned. Score: 3
Sequences (2:4) Aligned. Score: 3
Sequences (1:6) Aligned. Score: 2
Sequences (2:5) Aligned. Score: 3
Sequences (2:6) Aligned. Score: 10
Guide tree      file created: [clustalw.dnd]
Start of Multiple Alignment
There are 5 groups
Aligning...
Group 1: Sequences: 2      Score:32613
Group 2:                      Delayed
Group 3:                      Delayed
Group 4: Sequences: 2      Score:22721
Group 5: Sequences: 4      Score:12095
Sequence:6      Score:13071
Sequence:1      Score:12960
Alignment Score 47622
CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.sln]
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

```

Z29098      CGAGCCCAACCACTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTGCAGTGC6CAATGTTTAAC
Z29102      -----TAAC
U11641      -----
U11652      -----
L48685      -----
X01005      -----

```

```

Z29098      ACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTC8TCTCAAAGAGA
Z29102      ACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTC8TCTCAAAGAGA
U11641      -----
U11652      -----

```


5B

L48685
X01005

CACTTGAAGTC—GGAAG
CAGTGCTGGCCAAAAGA

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATTTTATTCTCTTCACGACGAAAAAAAGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAAT
ATTTTATTCTCTTCACGACGAAAAAAAGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAAT

TTTACATACACTTAAGTTGAGTCATTAAA—AGTCGTTTTTCAACTAGACCAGAAAA
TATCCA—CTTTTGGTTTTTTGTGTAA—CTTTTTTCTCAAGCATCCATTGAC

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATGAGTAATTTATTCAAACGGTTTGTCTTAAGAGATAAGAAAAAGTGACCACTATTAATT
ATGAGTAATTTATTCAAACGGTTTGTCTTAAGAGATAAGAAAAAGTGACCACTATTAATT
AACATGT
ATTAGGT
TTC—TTGTAA—CAACAAT—AGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTT
TTG—AATTTTCCGTGTGCATAAAGCGAAATGTACGCAAAATTTGCGGACCA—ACAT
* *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CGAACGCGCGCTAAGCTTACCTTAATCTCAAGAAAGCAAAAACAAAAGCAACTAATGTAA
CGAACGCGCGCTAAGCTTACCTTAATCTCAAGAAAGCAAAAACAAAAGCAACTAATGTAA
TGGCTG—ATAAGTCC—CCGGTTTGACAC—TAGTATTAATGCA—
TGGCTG—ATAAGTCC—CCGGTCTGACACATAGATGGCTGCTAGTATTAATGCA—
TGTGCATGACACAAGT—CATTTTCCAACAATTGT—TTACAGACAGATTATTTCA
TACATGATTATCGATTTTCTGAATTTTATTCAATTTT—TTGATTTTTCGTTTTCC
* * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CGGAATCATTATCTAGTTATGATCTGCAATAAT—GTCACAATACAGCATGCAAAAA
CGGAATCATTATCTAGTTATGATCTGCAATAAT—GTCACAATACAGCATGCAAAAA
TATTATTTTATATAGGACCAACCTTCAAATGATTCGTGTCAAAATTTGACGTC—
TATTATTTTATATAGTACCAACCTTCAAATGATTCGTGTCAAAATTTGACGTCGTAAAG
CTTATAATCACTGTATCACAATT—CCAGTGG—GTCAGAAGTTTACATACA—
AATTTTCATTATTTTGTGAATTATCAATAAAACGCACTGTGTTGTGCACTGG—A
* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

AATTTTAGATTGCTGCA—GATCAGTAGAAGTTTAGCAACGATGTTCTGTGTAACCTA
AATTTTAGATTGCTGCA—GATCAGTAGAAGTTTAGCAACGATGTTCTGTGTAACCTA
—AATTAGTTTGTGAGA—GCAAGTTTGTATTGTGAAGAAAA
TCAATTAGTTTGTGAGATAGAGCTCTTTTGTGAAGCAACTTTGTTATTGTGAAGAAAA
—CTAAGTTGACTGTG—CCTTTAAA—CAGCTTGGAAAAATTCAG—AAATGA
TTTGTGTTGTTGATAAAT—TATTTTAAAGGTATGTTAAATCTGTTGGGTGTAATAATC
* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

TTTCTAAAG—AAATCAGAGTATTGATTAGGGATTATTTTAAATCTGGAAAG
TTTCTAAAG—AAATCAGAGTATTGATTAGGGATTATTTTAAATCTGGAAAG
TGGAAAAAATTCATTTTCAATTTCTGTTTTGATAAAATCTGTTTTCTGAAGGGAAAA
TGGAAAAA—AGGAATTTCTGTTTTGATAAAATCTGTTTTCTGAAGGGAAAA
TGTGATGGC—TTTGAAGCTTC—TGATACTAATTGACATCATTTGAG
TTTCTTGG—ACGTCAAGAAAGCCATTGTAG—CTGGCTTCAACAAGGAAT
* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ACAGTTACGGAGATAAGCAAGCAATTAATTTGCCTAAGTCGTCTGTGCATGGGGTGAAT—
ACAGTTACGGAGATAAGCAAGCAATTAATTTGCCTAAGTCGTCTGTGCATGGGGTGAAT—
AA—TGCGGTGG—AAGCAAAAAAGTTGGCTTGATAATGATTTCCGGACTGTGCCCAA—
AA—TACAGTGG—AAGCAAAAAAGTTGGCTTGATAATGATTTCCGGACTGTGCCCAA—
TCAATT—GGAGGTGTACCTGTGATGATTT—CAAGGCTACCTTCA—AACGCAAT—
ACCCACGAAAAAGCTCGCGCTGCAAAATCAAGCTTCTCCGCTGACTATTTGGAAGTAATC

図5C

* *
 Z29098 ACAAATTTTCAAAAAA-AATGGGAATATTGAAAATAA-CA-TTGCBAATAGAGGCCGAA
 Z29102 ACAAATTTTCAAAAAA-AATGGGAATATTGAAAATAA-CA-TTGCBAATAGAGGCCGAA
 U11641 GGAAATCAATAATAATTGATTGATGCAAAATTCAGCG-AGGTGAAATGAGCACGGA
 U11652 GGAAATCAACAATAATTGATTGATGCAAAATTCAGCG-TGGTGAATGAGCACGGA
 L48685 GCCTCTTGTCTGACATAATGGGAAATCAAAAGAAATCAGCCACACCATGGGACCACG
 X01005 AAGAAATACCAAACTGAGGTGATTCBAAAAATATTATTTTAAATAATAATGTTTGA
 * * * * *
 Z29098 CATCAGCAA-TAACACCCCGCAGCAAAAGACAA-CTGGCCAAAATTGTTAAGGCTGAT
 Z29102 CATCAGCAA-TAACACCCCGCAGCAAAAGACAA-CTGGCCAAAATTGTTAAGGCTGAT
 U11641 GGACGCTGA-ACGCAATGGACGCCGAAAG-AG-GTGGTTACCGACGAAAA-
 U11652 GGACGCTGA-ACGCAATGGACGCCGAAAG-AG-GTGGTTACCGACGAAAA-
 L48685 CAGCCGTCA-TACCGCTCAGGAATGAGACGCATTCTGTCTCTAGAGATAAA-
 X01005 AATCCGTGCTTTGAGAAATCTGCCCGGAGGCTT-CGAGTGACAACCCATGAGTGGAT
 * * * * *
 Z29098 CGTCGCCAATCTTTGAGAAATTTGGCTTCTAAGTGGTCGCA-GCAATTGGCAAAACT
 Z29102 CGTCGCCAATCTTTGAGAAATTTGGCTTCTAAGTGGTCGCA-GCAATTGGCAAAACT
 U11641 CATCAAAAAATCCACAAAT-GATTTTGAATGACCGTAAAAATGAATGATCGAGAT
 U11652 CATCAAAAAATCCACAAAT-GATTTTGAATGACCGTAAAAATGAATGATCGAGAT
 L48685 CAT-ACTGTGGTGGCAAAAGT-GCAATCAATCCGAAACBACAGCAAAAGACCT
 X01005 CGC-AAGATCCTCCGATCAGCA-AGAGAAATCCGATAG-GACCGCCACGATAT
 * * * * *
 Z29098 GTCAAGCGAGAGTGGACGCGACAAATTAAGATAT-TGGATATGTTTTTATAAAGT
 Z29102 GTCAAGCGAGAGTGGACGCGACAAATTAAGATAT-TGGATATGTTTTTATAAAGT
 U11641 AACAAA-GGCCCTTAAACATATCAAA-GGAACGTGT-TGGTCATATCATTATCAAA-
 U11652 AGCAGA-GGCCCTTAAAGATATCAAA-GGAACGTGT-TGGTCATATCATTATCAAA-
 L48685 TGTGAA-GATGCTGGAGAAAACAGGTATGAATGTTTCTATATCCACAGTAAAAACGAGTC
 X01005 -TCAATGATTATAAGTCTCCAAATGAACCTGTAC-CAAGTAAACGAACTGTTCTGT
 * * * * *
 Z29098 ATGTTTTGTTATTACCTGTGCATCGTACCCAATAACTTACTCGTAATCTTACTCGTAGGC
 Z29102 ATGTTTTGTTATTACCTGTGCATCGTACCCAATAACTTACTCGTAATCTTACTCGTAGGC
 U11641 -TATTTGGATAT-GCGBAAGCTCTGTGCAAAATGGGTGCCGCGCAACTCACAT-TTGAC
 U11652 -TATTTGGATAT-GCGBAAGCTCTGTGCAAAATGGGTGCCGCGCAACTCACAT-TTGAC
 L48685 CTATATCGACATAACCTGAAAGGC-CGCTCAGCAAGGAAGAGCCA-CTGCTCCAAAAC
 X01005 GACGTTTACAGCAAGCAGGACTACACGACGA-AAGCCAGTCAAGAAACGTTTCATCAGT
 * * * * *
 Z29098 CAAGG-AAAAACCGTTGCTTACGCTTCGTCAAAAAAAGAGCGTTTGCAATGGG-CTCG
 Z29102 CAAGG-AAAAACCGTTGCTTACGCTTCGTCAAAAAAAGAGCGTTTGCAATGGG-CTCG
 U11641 CAAAA-ACAACAACGTGTTGATGATTCT-GAGCGGTGTTTGCAAGCTGT-TAAC
 U11652 CAAAA-ACAACAACGTGTTGATGATTCT-GAGCGGTGTTTGCAAGCTGT-TAAC
 L48685 CGCCATAAAAAAGCAGACTACGTTTGCAACTGCACATGGGACAAATATGGTACTTTT
 X01005 AAGAA-AAATCGCATGGCTCGAGTTGCTGGGCAAAAGC-GCATCTTCTGTTGGGACGTC
 * * * * *
 Z29098 GSAAGGATGTCTTGGACTCAAAGGCAATGGGATACCATCATATTGAGCGATGAAGCTAA
 Z29102 GSAAGGATGTCTTGGACTCAAAGGCAATGGGATACCATCATATTGAGCGATGAAGCTAA
 U11641 TCCTAATACACCCGAGTTTTTCCGTCGATATG-TAACAATGGATGAACATGGCTCCATC
 U11652 TCCTAATACACCCGAGTTTTTCCGTCGATATG-TGACAATGGATGAACATGGCTCCATC
 L48685 TGGAGAAATGTCCTCTCTCTGCTGATGAA-AAAAAATAGAACTATTGGCCAT
 X01005 AGGAATGGGCTAAACACATCTGCTGACGAA-AGCAAGTTCAATTTGTTGGGAGT
 * * * * *

図5D

Z29098	ATTTGATGTTAGTGTGCGGCGATACGAGAAAACGCGTCATCCBTAAGAGGTCAGAAACATA
Z29102	ATTTGATGTTAGTGTGCGGCGATACGAGAAAACGCGTCATCCBTAAGAGGTCAGAAACATA
U11641	ACTACACTCCTGAGTTCBATCAACAGTCSGCTGAGTGGACAGCGACCGGT—GAACCGTC
U11652	ACTACACTCCTGAGTCCAAACGACAGTCSGCTGAGTGGACAGCGACCGGT—GAACCGTC
L48685	AATGACCATCCTTAT—GTTTGGAGGAAAAAGGGGAGCTTCCAAGCCG—AAGATCA
X01005	GATGGAAATTCCTG—GGTACGTCGTCGTGTTGGCTCTAGGTACTGTCCAAAGTA
	* * *
Z29098	CCATAAAGACTGCGTTAAAAGAACAAAGTTTCTGCGAGCACTATGATGGBGATG
Z29102	CCATAAAGACTGCGTTAAAAGAACAAAGTTTCTGCGAGCACTATGATGGBGATG
U11641	TCCGAAG—CGTGGAAAGACTCAAAAGTCCGCTGGCAAAGTAATGGCCTCTGTTTT
U11652	TCCGAAG—CGTGGAAAGACTCAAAAGTCCGCTGGCAAAGTAATGGCCTCTGTTTT
L48685	CCATC—CCAAGCGTGAAGCACGGGGG—TGGCAGCATCATGTTGTGGGGGTG
X01005	TCAATGC—CCAACGTTAAGCATGGAGG—TGGGAGCGTCATGTTGTGGGGGTG
	* * * * *
Z29098	TATGTCTGCCAAAGGATTAGGAAAACCTTCATTTCAATTGAAGGGACAGTTAATGCTGAAAA
Z29102	TATGTCTGCCAAAGGATTAGGAAAACCTTCATTTCAATTGAAGGGACAGTTAATGCTGAAAA
U11641	TTGGAATGCCCATGGAATAATTTTATCGATTATCTTGAGAAGGAAAAACCATCAACAG
U11652	TTTGGATGCGCATGGAATAATTTTATCGATTATCTTGAGAAGGAAAAACCATCAACAG
L48685	CTTTGCTGCAGGAGGGAAGTGGTGCACCTTCACAAAATAGATGGCATCATGACAAAGGAAAA
X01005	CTTGACCAGCACTTCATGGGCCCACTAAGGAGAAATCCAAAGCATTATGGATCGTTTCA
	* * *
Z29098	ATATATTAAATATTTACAGATAGTTTGTGGCCATCAATACCAAACTATTAGATTGCGG
Z29102	ATATATTAAATATTTACAGATAGTTTGTGGCCATCAATACCAAACTATTAGATTGCGG
U11641	—TGACTATTATATGGCGTTATTGTAGCGTTTGAAGGTGGAATCGCGGCAAAATGG
U11652	—TGACTATTATATGGCGTTATTGTAGCGTTTGAAGGTGGAATCGCGGCAAAACGG
L48685	TTATGTGGCTATATTGAAGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTCAAGCTTGGTCA
X01005	ATACBAAAACATCTTTGAAACTACAATGCGACCTGGGCACTTCAAAATGTGGGCCGTGG
	** * * *
Z29098	TGAATTCAGTTTTCAGCAGGACGGAGCATCATCGCAC—ACAGCCAAAGCGAACCAAAA
Z29102	TGAATTCAGTTTTCAGCAGGACGGAGCATCATCGCAC—ACAGCCAAAGCGAACCAAAA
U11641	—CCCCATATGAAGAAGAAAAAGTGTGTTTTCGACCAAGACAATGCACCGTCCACAA
U11652	—CCCCATATGAAGAAGAAAAAGTGTGTTTTCGACCAAGACAATGCACCGTCCACAA
L48685	CAAAATGGGTCTTCCAAATGGACAATGACCTCAAGCAT—ACTTCCAAAGTTGTGGCAA
X01005	C—TTCGTGTTTCAGCAGGATAACGATCGTAAGCAT—ACTTCTGTTGATGTGCGTT
	* * * * *
Z29098	ATTGGCTGCAATATAATCAAATGGAAGTTTATAGATTGGCCATCAAATAGTCCAGATCTAA
Z29102	ATTGGCTGCAATATAATCAAATGGAAGTTTATAGATTGGCCATCAAATAGTCCAGATCTAA
U11641	GTCAATGAAGACGATGGCAAA—AATTCATGAATTGGGCTTCGAATTGCTTCCCCACCC
U11652	GTCAATGAAGACGATGGCAAA—AATTCATGAATTGGGCTTCGAATTGCTTCCCCACCC
L48685	AATGGCTTAAGGTCAACAAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACAAGGCTCTGACCTCA
X01005	CATGGTTTCAACGTGTCATGTGCATTTGCTCGATTGGCCAAGTCAGTCTCCGGACTTGA
	* * * * *
Z29098	GCCCAATTGAAAAATATTTGGTGGCTAATGAAAAACCAGCTT—CGAAAT—GAGCC—ACA
Z29102	GCCCAATTGAAAAATATTTGGTGGCTAATGAAAAACCAGCTT—CGAAAT—GAGCC—ACA
U11641	ACTATATTCTCCAGATCTGGCCCCAGCGAATTTTCTTGT—TCTCA—GACCT—CAA
U11652	ACCGTATTCTCCAGATCTGGCCCCAGCGAATTTTCTTGT—TCTCA—GACCT—CAA
L48685	ATCCTATAGAAAGGAGGAATGAGCCAAAATTCACCCAAGTTATTGTGGG—AAGCTTGTG
X01005	ATCCAATAGAGCATTGTGGGAAGAGTTGGAAGAGCGTCTTGGAGGTATTCGGGCT—TCA
	** * *
Z29098	AAGGAATATTTCTGACTTGAAAAATCAAGTTGCAAGAGATGTGGGACTCAATTTCTCAAGA
Z29102	AAGGAATATTTCTGACTTGAAAAATCAAGTTGCAAGAGATGTGGGACTCAATTTCTCAAGA

図5E

図5E

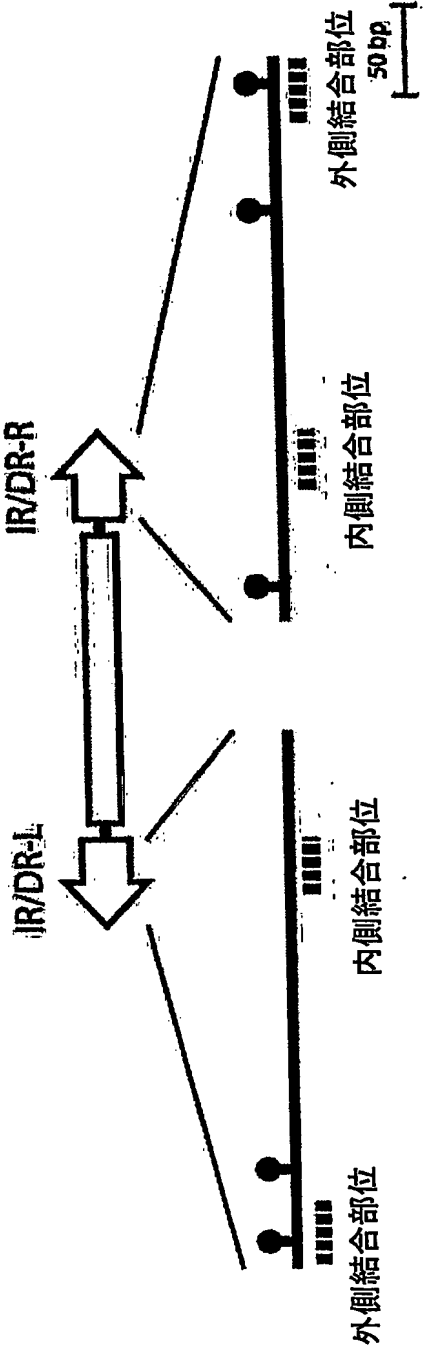
U11641	AAGGATGCTCGCAGGGAAAAAATTTGGCTGCAATGAA	—	GAGG
U11652	AAGG-ATGCTCGCAGGGAAAAAATTTGGCTGCAATGAA	—	GAGG
L48685	GAAGGCTACTCGAAATGTTTGACCCAAAGTTAAACAATTT	—	AAAG
X01005	AATGCAGATGCCAAATTC—AACCAGTTGAAAAACGCTTGAAAAGCTATCCCATGTCA		
	* *	*	*
Z29098	GCATTGCAAAAAATTTGTTAAGCTCAATGCCAAAACGABTTAAATGCGTAATGCAGGCCAA		
Z29102	GCATTGCAAAAAATTTGTTAAGCTCAATGCCAAAACGABTTAAATGCGTAATGCAGGCCAA		
U11641	TAATCGCCGAAAC—TAAGGCGTATTTTGAGGCAAAACCGTAAGAGTACTA—CCA		
U11652	TGATCGCCGAAAC—TGAGGCGTATTTTGAGGCAAAACCGTAAGAGTACTA—CCA		
L48685	GCAATGCTA—CCAAATACTAATTGAGTGTATGTTAACTTC—TGACCCA—CTGG		
X01005	GTTATTCACAAAGCTGATCGA—GTCGATGCCACGTCGTTGTCAAGCTGTTATTGATGCAAA		
	*	*	*
Z29098	GGGCGACGTTACACAATTGTAATATTAATTAAATTATTGTTTTAAGTATGATAGTAAATC		
Z29102	GGGCGACGTTACACAATTGTAATATTAATTAAATTATTGTTTTAAGTATGATAGTAAATC		
U11641	AAATGATATCAAAAAATTGGAAGGTCGTTATAATCGTGGTATCGCTGTTGA—AGGGGACT		
U11652	AAATGATATCAAAAAATTGGAAGGTCGTTATAATCGTGGTATCGCTGTTGA—AGGGGACT		
L48685	GAATGTGATGAAGAAATAAAAGCTGAAATGAATCATTCTCTGACTATTATTCTG—		
X01005	CGGATACGCBACAAAGTATTAAGCATAATTATGTTGT—TTTTAAATCCAATTGCG—TC		
	* * *	**	* * * *
Z29098	ACATTACGCCGCGTTGCAATTAATAGTGGTCACTTTTTCTTATCTGTTAAGCAAAACCGT		
Z29102	ACATTACGCCGCGTTGCAATTAATAGTGGTCACTTTTTCTTATCTGTTAAGCAAAACCGT		
U11641	ATGTTGAATAATAA—AAACGAATTTTGACAAAAAA—TGTTGTTTCTTTGTTAGACCGG		
U11652	ATGTTGAATAATAA—AAACGAATTTTGACAAAAAA—TGTTGTTTCTTTGTTAGACCGG		
L48685	ATATTTACATTCTTAAATAAAA—GTGGTGA—TCCTAACTGACCTTAAGACAGGGAAAT		
X01005	ATATTCGGTACTT—TAATTGTCATTTCCGTTGCAACCTCGGTTTTTTCAATATTT		
	* **	** *	* *
Z29098	TTGAATAAATTAATCATATTTTTGTTGTTGTTGGAAATAGAGCAAAACCTTTTTTTTCGT		
Z29102	TTGAATAAATTAATCATATTTTTGTTGTTGTTGGAAATAGAGCAAAACCTTTTTTTTCGT		
U11641	—GGACTTATCACCACACCTGTTA—		
U11652	—GGACTTATCAGCCACCTGTTA—		
L48685	C—TTTACTCGGATTAATGTCAGGAATTGTGAAAAAGTGAATTTAAATGTATTG—GC		
X01005	C—TAGTTTTTCGATTTTTTGAATTTTTCTGAAGTTTTTCAAAATCTGTTGAACAT		
	*		
Z29098	CGTGAAGAGAATAAAATTGCTTTGAGACGAAATGCATTGGTATGTGTTATCTTTAGTAG		
Z29102	CGTGAAGAGAATAAAATTGCTTTGAGACGAAATGCATTGGTATGTGTTATCTTTAGTAG		
U11641	—		
U11652	—		
L48685	TAAGGTGTATGTAAACTTCCGACTTCAACTG—		
X01005	TTTTG—ATGAATATTGTGTTTTAGATTTTGTGAACACTGTGGTGAAGTTTCAAAACA		
Z29098	TATTGATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGCACTGCAAAAAAACATGCTGTTGCAATTA		
Z29102	TATTGATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGCACTGCAAAAAAACATGCTGTTGCAATTA		
U11641	—		
U11652	—		
L48685	—		
X01005	AAATAACCACTTAGAAAAAAGTTACACACAAAAAACCAAAAGTGGATATCTTTTTGGCCA		
Z29098	ATAGTGGTTGGGGCTCG		
Z29102	ATAGTGGTTGGGGCTCG		
U11641	—		
U11652	—		

図5F

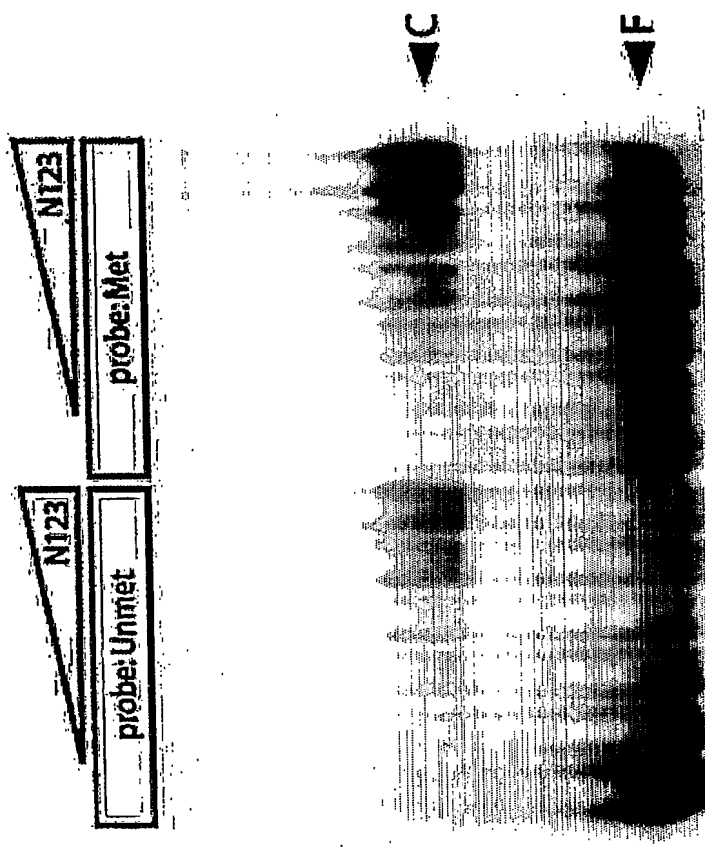
L48685	_____
X01005	GCACTB _____

(
(
X01005:0.47463,
(
U11641:0.02397,
U11652:0.01879)
:0.47911)
:0.01531,
(
Z29098:0.00029,
Z29102:0.00029)
:0.42978,
L48685:0.46683):

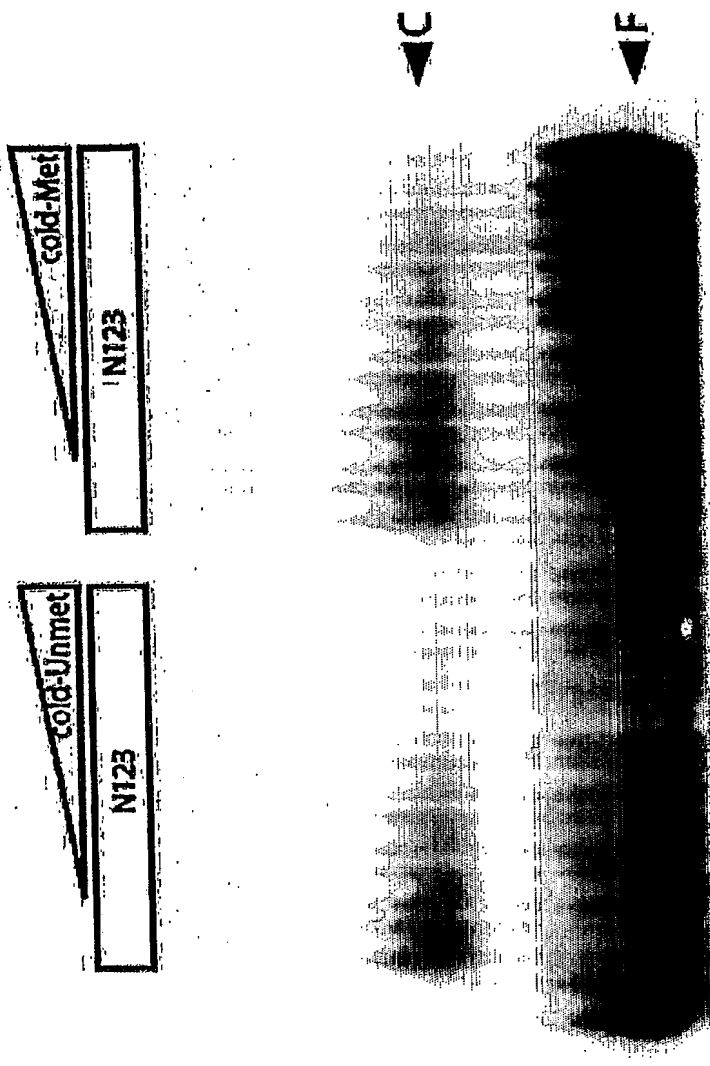
図6A



6B



6C



6D

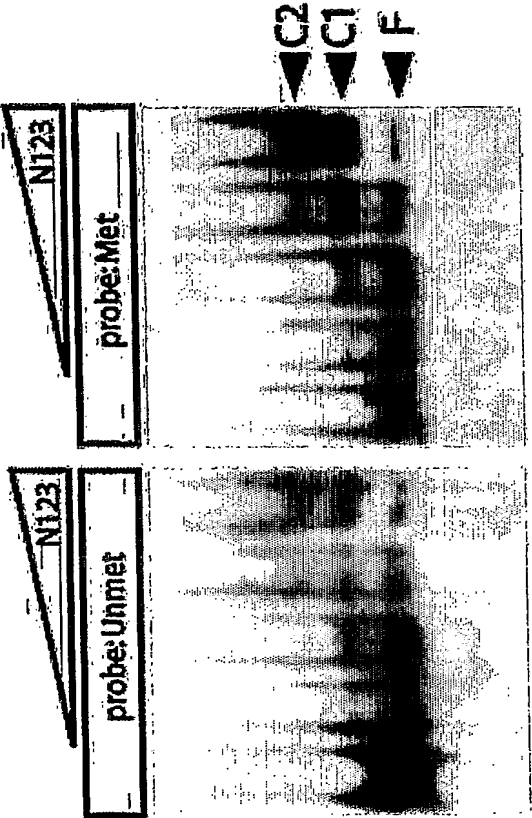
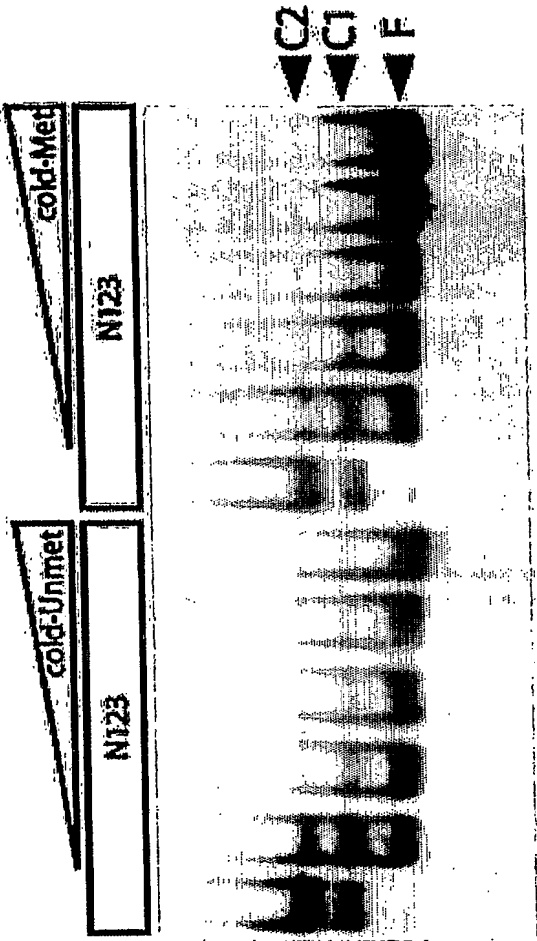


図6E



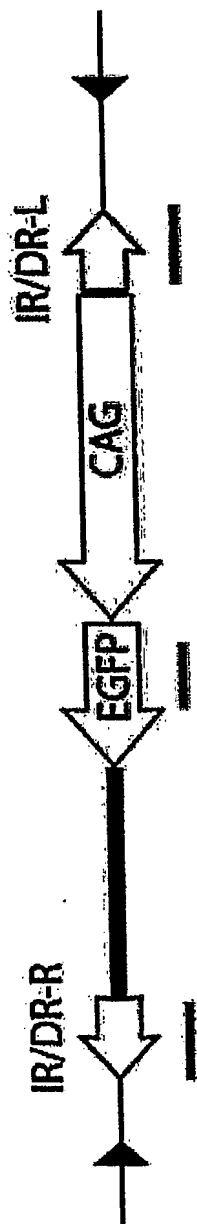


Fig. 7A

図7B

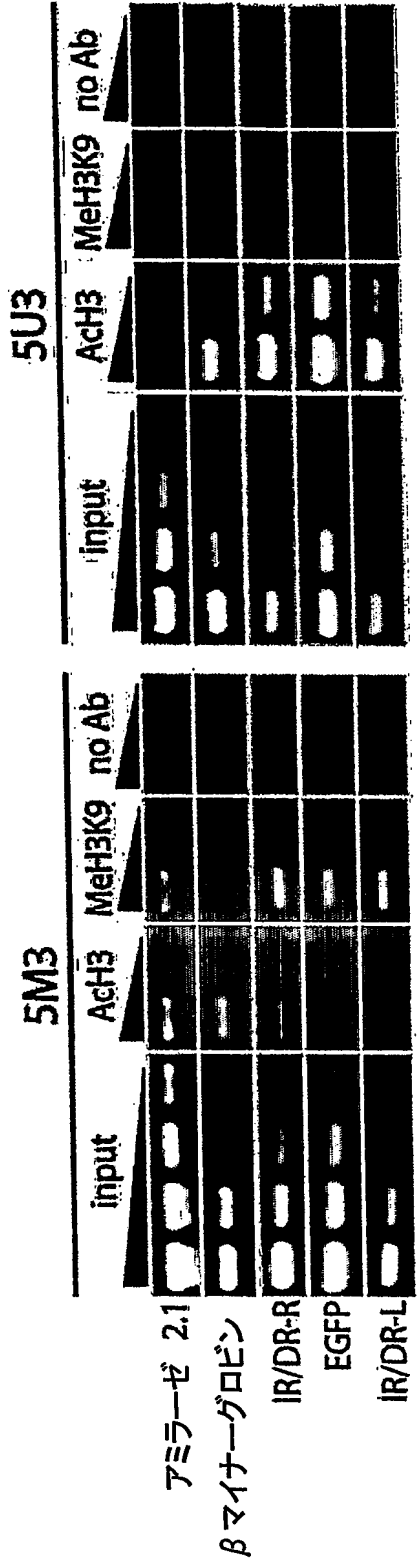
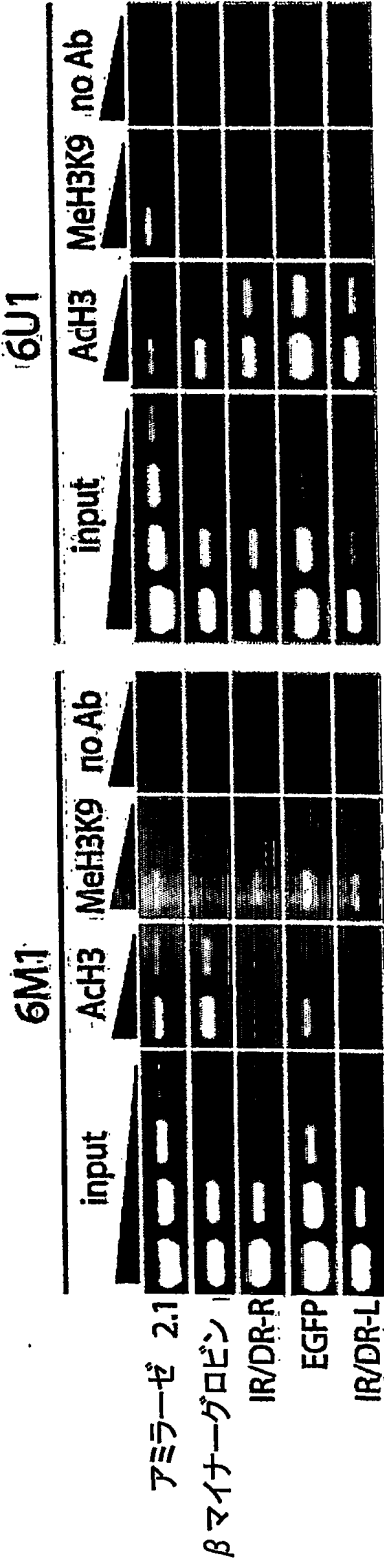


図7C



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

TAKEDA, Junji

HORIE, Kyoji

<120> Method and sysytem for producing transgenic organisms using
methylation

<130> KJ007PCT

<150> PCT/JP03/08681

<151> 2003-07-08

<160> 76

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1455

<212> DNA

<213> Tanichthys albonubes

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1455)

<223> /note="Tc1-like transposon"

<300>

<308> L48685

<309> 1996-05-31

<313> (1)..(1455)

<400> 1

cagttgaagt cggaagtta catacactta agttggagtc attaaaactc gtttttcaac

60

tacaccacaa atttcttgtt aacaaacaat agttttggca agtcagttag gacatctact 120

ttgtgcatga cacaagtcac tttccaaca attgtttaca gacagattat ttcacttata 180

attcactgta tcacaattcc agtgggtcag aagtttacat acactaagtt gactgtgcct 240

ttaaacagct tggaaaatcc cagaaaatga tgtcatggct ttagaagctt ctgatagact 300

aattgacatc atttgagtca attggagggtg tacctgtgga tgtatttcaa ggcctacctt 360

caaacgcagt gcctctttgc ttgacataat gggaaaatca aaagaaatca gccaacacca 420

tgggaccacg cagccgtcat accgctcagg aatgagacgc attctgtctc ctagagataa 480

acatactgtg gtgcgaaaag tgcaaatcaa tcccagaacg acagcaaagg accttgtgaa 540

gatgctggag aaaacaggta tgaatgtttc tatatccaca gtaaaaacga gtcctatata 600

gacataacct gaaaggccgc tcagcaagga agaagccact gtcctaaaaac cgccataaaa 660

aagccagact acggtttgca actgcacatg gggacaaata tggtaactttt tggagaaatg 720

tcctctcttc tggctgatg aaaaaaaaaat agaactattt ggccataatg accatcgta 780

tgtttggagg aaaaaggggg agcttgcaag ccgaagatca ccatccaag cgtgaagcac 840

gggggtggca gcatcatggt gtgggggtgc tttgctgcag gagggactgg tgcacttcac 900

aaaatagatg gcatcatgac aaaggaaaat tatgtggcta tattgaagca acatctcaag 960

acatcagtca ggaagtcaa gcttggtcac aaatgggtct tccaaatgga caatgacctc 1020

aagcatactt ccaaagttgt ggcaaatgg ctttaaggta acaaagtcaa ggtattggag 1080

tggccatcac aaagctctga cctcaatcct atagaaagga ggaatgagcc aaaattcacc 1140

caacttattg tgggaagcgt gtggaaggct actcgaaatg ttgacccaa gttaaacaat 1200
 ttaaaggcaa tgctaccaa tactaattga gtgtatgta acttctgacc cactgggaat 1260
 gtgatgaaag aaataaaagc tgaaatgaat cattotctct actattatto tgatatttca 1320
 cattcttaaa ataaagtggg gatcctaact gaccttaaga cagggaatct ttactcggat 1380
 taaatgtcag gaattgtgaa aaagtgagtt taaatgtatt tggctaaggt gtatgtaaac 1440
 ttccgacttc aactg 1455

<210> 2

<211> 1023

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sleeping Beauty transposase

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1023)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1023)

<223> Sleeping Beauty transposase

<400> 2

atg gga aaa tca aaa gaa atc agc caa gac ctc aga aaa aaa att gta 48
 Met Gly Lys Ser Lys Glu Ile Ser Gln Asp Leu Arg Lys Lys Ile Val
 1 5 10 15

gac ctc cac aag tct ggt tca tcc ttg gga gca att tcc aaa cgc ctg	96
Asp Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Ile Ser Lys Arg Leu	
20 25 30	
aaa gta cca cgt tca tct gta caa aca ata gta cgc aag tat aaa cac	144
Lys Val Pro Arg Ser Ser Val Gln Thr Ile Val Arg Lys Tyr Lys His	
35 40 45	
cat ggg acc acg cag ccg tca tac cgc tca gga agg aga cgc gtt ctg	192
His Gly Thr Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Ser Gly Arg Arg Arg Val Leu	
50 55 60	
tct cct aga gat gaa cgt act ttg gtg cga aaa gtg caa atc aat ccc	240
Ser Pro Arg Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Lys Val Gln Ile Asn Pro	
65 70 75 80	
aga aca aca gca aag gac ctt gtg aag atg ctg gag gaa aca ggt aca	288
Arg Thr Thr Ala Lys Asp Leu Val Lys Met Leu Glu Glu Thr Gly Thr	
85 90 95	
aaa gta tct ata tcc aca gta aaa cga gtc cta tat cga cat aac ctg	336
Lys Val Ser Ile Ser Thr Val Lys Arg Val Leu Tyr Arg His Asn Leu	
100 105 110	
aaa ggc cgc tca gca agg aag aag cca ctg ctc caa aac cga cat aag	384
Lys Gly Arg Ser Ala Arg Lys Lys Pro Leu Leu Gln Asn Arg His Lys	
115 120 125	
aaa gcc aga cta cgg ttt gca act gca cat ggg gac aaa gat cgt act	432
Lys Ala Arg Leu Arg Phe Ala Thr Ala His Gly Asp Lys Asp Arg Thr	
130 135 140	
ttt tgg aga aat gtc ctc tgg tct gat gaa aca aaa ata gaa ctg ttt	480
Phe Trp Arg Asn Val Leu Trp Ser Asp Glu Thr Lys Ile Glu Leu Phe	
145 150 155 160	

ggc cat aat gac cat cgt tat gtt tgg agg aag aag ggg gag gct tgc	528
Gly His Asn Asp His Arg Tyr Val Trp Arg Lys Lys Gly Glu Ala Cys	
165 170 175	
aag ccg aag aac acc atc cca acc gtg aag cac ggg ggt ggc agc atc	576
Lys Pro Lys Asn Thr Ile Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Ile	
180 185 190	
atg ttg tgg ggg tgc ttt gct gca gga ggg act ggt gca ctt cac aaa	624
Met Leu Trp Gly Cys Phe Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Leu His Lys	
195 200 205	
ata gat ggc atc atg agg aag gaa aat tat gtg gat ata ttg aag caa	672
Ile Asp Gly Ile Met Arg Lys Glu Asn Tyr Val Asp Ile Leu Lys Gln	
210 215 220	
cat ctc aag aca tca gtc agg aag tta aag ctt ggt cgc aaa tgg gtc	720
His Leu Lys Thr Ser Val Arg Lys Leu Lys Leu Gly Arg Lys Trp Val	
225 230 235 240	
ttc caa atg gac aat gac ccc aag cat act tcc aaa gtt gtg gca aaa	768
Phe Gln Met Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Lys Val Val Ala Lys	
245 250 255	
tgg ctt aag gac aac aaa gtc aag gta ttg gag tgg cca tca caa agc	816
Trp Leu Lys Asp Asn Lys Val Lys Val Leu Glu Trp Pro Ser Gln Ser	
260 265 270	
cct gac ctc aat cct ata gaa aat ttg tgg gca gaa ctg aaa aag cgt	864
Pro Asp Leu Asn Pro Ile Glu Asn Leu Trp Ala Glu Leu Lys Lys Arg	
275 280 285	
gtg cga gca agg agg cct aca aac ctg act cag tta cac cag ctc tgt	912
Val Arg Ala Arg Arg Pro Thr Asn Leu Thr Gln Leu His Gln Leu Cys	
290 295 300	

cag gag gaa tgg gcc aaa att cac cca act tat tgt ggg aag ctt gtg 960
 Gln Glu Glu Trp Ala Lys Ile His Pro Thr Tyr Cys Gly Lys Leu Val
 305 310 315 320

gaa ggc tac ccg aaa cgt ttg acc caa gtt aaa caa ttt aaa ggc aat 1008
 Glu Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Thr Gln Val Lys Gln Phe Lys Gly Asn
 325 330 335

gct acc aaa tac tag 1023
 Ala Thr Lys Tyr
 340

<210> 3

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Met Gly Lys Ser Lys Glu Ile Ser Gln Asp Leu Arg Lys Lys Ile Val
 1 5 10 15

Asp Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Ile Ser Lys Arg Leu
 20 25 30

Lys Val Pro Arg Ser Ser Val Gln Thr Ile Val Arg Lys Tyr Lys His
 35 40 45

His Gly Thr Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Ser Gly Arg Arg Arg Val Leu
50 55 60

Ser Pro Arg Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Lys Val Gln Ile Asn Pro
65 70 75 80

Arg Thr Thr Ala Lys Asp Leu Val Lys Met Leu Glu Glu Thr Gly Thr
85 90 95

Lys Val Ser Ile Ser Thr Val Lys Arg Val Leu Tyr Arg His Asn Leu
100 105 110

Lys Gly Arg Ser Ala Arg Lys Lys Pro Leu Leu Gln Asn Arg His Lys
115 120 125

Lys Ala Arg Leu Arg Phe Ala Thr Ala His Gly Asp Lys Asp Arg Thr
130 135 140

Phe Trp Arg Asn Val Leu Trp Ser Asp Glu Thr Lys Ile Glu Leu Phe
145 150 155 160

Gly His Asn Asp His Arg Tyr Val Trp Arg Lys Lys Gly Glu Ala Cys
165 170 175

Lys Pro Lys Asn Thr Ile Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Ile
180 185 190

Met Leu Trp Gly Cys Phe Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Leu His Lys
195 200 205

Ile Asp Gly Ile Met Arg Lys Glu Asn Tyr Val Asp Ile Leu Lys Gln
210 215 220

His Leu Lys Thr Ser Val Arg Lys Leu Lys Leu Gly Arg Lys Trp Val
225 230 235 240

Phe Gln Met Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Lys Val Val Ala Lys
245 250 255

Trp Leu Lys Asp Asn Lys Val Lys Val Leu Glu Trp Pro Ser Gln Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Asn Pro Ile Glu Asn Leu Trp Ala Glu Leu Lys Lys Arg
275 280 285

Val Arg Ala Arg Arg Pro Thr Asn Leu Thr Gln Leu His Gln Leu Cys
290 295 300

Gln Glu Glu Trp Ala Lys Ile His Pro Thr Tyr Cys Gly Lys Leu Val
305 310 315 320

Glu Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Thr Gln Val Lys Gln Phe Lys Gly Asn
325 330 335

Ala Thr Lys Tyr

340

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Left outside sequence

<400> 4

gttgaagtcg gaagtttaca ctagg

26

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Left inside sequence

<400> 5

ccagtgggtc agaagtttac atacactaag

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-1U

<400> 6

gaccgcttcc tcgtgcttta cggatgc

27

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-2L

<400> 7

acacaggaaa cagctatgac catgattacg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-2U

<400> 8

tctatcgccct tcttgacgag ttcttctgag

30

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-3L

<400> 9

caagcgcgca attaacccctc actaaagg

28

<210> 10

<211> 1610

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1610)

<223> Transposon="Tc1"

<220>

<221> CDS

<222> (523)..(1344)

<300>

<308> X01005

<309> 2002-07-07

<313> (1)..(1610)

<400> 10

cagtgtctggc caaaaagata tccacttttg gttttttgtg tgtaactttt ttctcaagca 60

tccatttgac ttgaattttt ccgtgtgcat aaagcgaaat gttacgcaaa ttgctggacc 120

aaacattaca tgattatoga tttttctga attttatttc aattttttga ttttttcgtt 180

tttccaattt tcattatttt ttttgaatta tcaataaaac gcactctgtt tgttgactg 240

gatttgtttg gttgataaat tatttttaag gtatggtaaa atctgttggg tgtaaaaatc 300

tttccttgga ogtcaagaaa gccattgtag ctggcttcga acaaggaata cccacgaaaa 360

gctcgcgctg caaatccaac gtctcgcgtc gactatttgg aaagtaatca agaagtacca 420
 aactgagggtg agttcgaaaa atattatttt ttaataataa atgttttagaa atccgtcgcgt 480
 ttgagaatct cgcccggcag gcctcgagtg acaaccata gg atg gat cgc aac 534
 Met Asp Arg Asn
 1
 atc ctc cga tca gca aga gaa gat ccg cat agg acc gcc acg gat att 582
 Ile Leu Arg Ser Ala Arg Glu Asp Pro His Arg Thr Ala Thr Asp Ile
 5 10 15 20
 caa atg att ata agt tct cca aat gaa cct gta cca agt aaa cga act 630
 Gln Met Ile Ile Ser Ser Pro Asn Glu Pro Val Pro Ser Lys Arg Thr
 25 30 35
 gtt cgt cga cgt tta cag caa gca gga cta cac gga cga aag cca gtc 678
 Val Arg Arg Arg Leu Gln Gln Ala Gly Leu His Gly Arg Lys Pro Val
 40 45 50
 aag aaa ccg ttc atc agt aag aaa aat cgc atg gct cga gtt gcg tgg 726
 Lys Lys Pro Phe Ile Ser Lys Lys Asn Arg Met Ala Arg Val Ala Trp
 55 60 65
 gca aaa gcg cat ctt cgt tgg gga cgt cag gaa tgg gct aaa cac atc 774
 Ala Lys Ala His Leu Arg Trp Gly Arg Gln Glu Trp Ala Lys His Ile
 70 75 80
 tgg tct gac gaa agc aag ttc aat ttg ttc ggg agt gat gga aat tcc 822
 Trp Ser Asp Glu Ser Lys Phe Asn Leu Phe Gly Ser Asp Gly Asn Ser
 85 90 95 100
 tgg gta cgt cgt cct gtt ggc tct agg tac tct cca aag tat caa tgc 870
 Trp Val Arg Arg Pro Val Gly Ser Arg Tyr Ser Pro Lys Tyr Gln Cys
 105 110 115

cca acc gtt aag cat gga ggt ggg agc gtc atg gtg tgg ggg tgc ttc	918
Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Val Met Val Trp Gly Cys Phe	
120 125 130	
acc agc act tcc atg ggc cca cta agg aga atc caa agc att atg gat	966
Thr Ser Thr Ser Met Gly Pro Leu Arg Arg Ile Gln Ser Ile Met Asp	
135 140 145	
cgt ttt caa tac gaa aac atc ttt gaa act aca atg cga ccc tgg gca	1014
Arg Phe Gln Tyr Glu Asn Ile Phe Glu Thr Thr Met Arg Pro Trp Ala	
150 155 160	
ott caa aat gtg ggc cgt ggc ttc gtg ttt cag cag gat aac gat cct	1062
Leu Gln Asn Val Gly Arg Gly Phe Val Phe Gln Gln Asp Asn Asp Pro	
165 170 175 180	
aag cat act tct ctt cat gtg cgt tca tgg ttt caa cgt cgt cat gtg	1110
Lys His Thr Ser Leu His Val Arg Ser Trp Phe Gln Arg Arg His Val	
185 190 195	
cat ttg ctc gat tgg cca agt cag tct ccg gac ttg aat cca ata gag	1158
His Leu Leu Asp Trp Pro Ser Gln Ser Pro Asp Leu Asn Pro Ile Glu	
200 205 210	
cat ttg tgg gaa gag ttg gaa aga cgt ctt gga ggt att cgg gct tca	1206
His Leu Trp Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Gly Gly Ile Arg Ala Ser	
215 220 225	
aat gca gat gcc aaa ttc aac cag ttg gaa aac gct tgg aaa gct atc	1254
Asn Ala Asp Ala Lys Phe Asn Gln Leu Glu Asn Ala Trp Lys Ala Ile	
230 235 240	
ccc atg tca gtt att cac aag ctg atc gac tog atg cca cgt cgt tgt	1302
Pro Met Ser Val Ile His Lys Leu Ile Asp Ser Met Pro Arg Arg Cys	
245 250 255 260	

caa gct gtt att gat gca aac gga tac gcg aca aag tat taa 1344

Gln Ala Val Ile Asp Ala Asn Gly Tyr Ala Thr Lys Tyr

265

270

gcataattat gttgttttta aatccaattg ctcatattcc ggtactttta ttgtcatttc 1404

cttgcaacct oggttttttc aatattttcta gtttttcgat ttttttgaat ttttttgaag 1464

ttttttcaaa atctgttgaa catttttgat gaatatgtg ttttttagatt ttgtgaacac 1524

tgtggtgaag ttcaaaaaca aaataaccac ttagaaaaaa gttacacaca aaaaaccaaa 1584

agtggatatc tttttggcca gcactg 1610

<210> 11

<211> 273

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 11

Met Asp Arg Asn Ile Leu Arg Ser Ala Arg Glu Asp Pro His Arg Thr

1

5

10

15

Ala Thr Asp Ile Gln Met Ile Ile Ser Ser Pro Asn Glu Pro Val Pro

20

25

30

Ser Lys Arg Thr Val Arg Arg Arg Leu Gln Gln Ala Gly Leu His Gly

35

40

45

Arg Lys Pro Val Lys Lys Pro Phe Ile Ser Lys Lys Asn Arg Met Ala

50 55 60

Arg Val Ala Trp Ala Lys Ala His Leu Arg Trp Gly Arg Gln Glu Trp
65 70 75 80

Ala Lys His Ile Trp Ser Asp Glu Ser Lys Phe Asn Leu Phe Gly Ser
85 90 95

Asp Gly Asn Ser Trp Val Arg Arg Pro Val Gly Ser Arg Tyr Ser Pro
100 105 110

Lys Tyr Gln Cys Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Val Met Val
115 120 125

Trp Gly Cys Phe Thr Ser Thr Ser Met Gly Pro Leu Arg Arg Ile Gln
130 135 140

Ser Ile Met Asp Arg Phe Gln Tyr Glu Asn Ile Phe Glu Thr Thr Met
145 150 155 160

Arg Pro Trp Ala Leu Gln Asn Val Gly Arg Gly Phe Val Phe Gln Gln
165 170 175

Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Leu His Val Arg Ser Trp Phe Gln
180 185 190

Arg Arg His Val His Leu Leu Asp Trp Pro Ser Gln Ser Pro Asp Leu

195 200 205

Asn Pro Ile Glu His Leu Trp Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Gly Gly
210 215 220

Ile Arg Ala Ser Asn Ala Asp Ala Lys Phe Asn Gln Leu Glu Asn Ala
225 230 235 240

Trp Lys Ala Ile Pro Met Ser Val Ile His Lys Leu Ile Asp Ser Met
245 250 255

Pro Arg Arg Cys Gln Ala Val Ile Asp Ala Asn Gly Tyr Ala Thr Lys
260 265 270

Tyr

<210> 12
<211> 1801
<212> DNA
<213> Drosophila hydei

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(1787)
<223> /note="transposon"

<220>
<221> CDS

<222> (347)..(760)

<220>

<221> CDS

<222> (821)..(1489)

<300>

<308> Z29098

<309> 1993-12-22

<313> (1)..(1801)

<400> 12

taatatatat tatacagacc ccaaccacta ttaattcgaa cagcatgttt tttttgcagt	60
gcgcaatggt taacacacta tattatcaat actactaaag ataacacata ccaatgcatt	120
tctgtctcaaa gagaatttta ttctcttcac gacgaaaaaa aaagttttgc tctatttcca	180
acaacaacaa aaatatgagt aatttattca aacggtttgc ttaagagata agaaaaaagt	240
gaccactatt aattogaacg cggcgtaagc ttaccttaat ctcaagaaga gcaaaacaaa	300
agcaactaat gtaacggaat cattatctag ttatgatctg caaata atg tca caa	355
	Met Ser Gln
	1
tac agc atg caa aaa aat ttt aga ttg ctg cag atc agt aga agt tta	403
Tyr Ser Met Gln Lys Asn Phe Arg Leu Leu Gln Ile Ser Arg Ser Leu	
5 10 15	
gca acg atg gtt cgt ggt aaa cct att tct aaa gaa atc aga gta ttg	451
Ala Thr Met Val Arg Gly Lys Pro Ile Ser Lys Glu Ile Arg Val Leu	
20 25 30 35	
att agg gat tat ttt aaa tct gga aag aca ctt acg gag ata agc aag	499
Ile Arg Asp Tyr Phe Lys Ser Gly Lys Thr Leu Thr Glu Ile Ser Lys	

40	45	50	
caa tta aat ttg cct aag tcg tot gtg cat ggg gtg ata caa att ttc			547
Gln Leu Asn Leu Pro Lys Ser Ser Val His Gly Val Ile Gln Ile Phe			
55	60	65	
aaa aaa aat ggg aat att gaa aat aac att gcg aat aga ggc cga aca			595
Lys Lys Asn Gly Asn Ile Glu Asn Asn Ile Ala Asn Arg Gly Arg Thr			
70	75	80	
tca gca ata aca ccc cgc gac aaa aga caa ctg gcc aaa att gtt aag			643
Ser Ala Ile Thr Pro Arg Asp Lys Arg Gln Leu Ala Lys Ile Val Lys			
85	90	95	
gct gat cgt cgc caa tct ttg aga aat ttg gct tct aag tgg tcg cag			691
Ala Asp Arg Arg Gln Ser Leu Arg Asn Leu Ala Ser Lys Trp Ser Gln			
100	105	110	115
caa ttg gca aaa ctg tca agc gag agt gga cgc gac aaa tta aaa agt			739
Gln Leu Ala Lys Leu Ser Ser Glu Ser Gly Arg Asp Lys Leu Lys Ser			
120	125	130	
att gga tat ggt ttt tat aaa gtatgttttg ttattacctg tgcatogtac			790
Ile Gly Tyr Gly Phe Tyr Lys			
135			
ccaataactt actcgtaatc ttactogtag gcc aag gaa aaa ccc ttg ctt acg			844
Ala Lys Glu Lys Pro Leu Leu Thr			
140	145		
ctt cgt caa aaa aag aag cgt ttg caa tgg gct cgg gaa agg atg tct			892
Leu Arg Gln Lys Lys Lys Arg Leu Gln Trp Ala Arg Glu Arg Met Ser			
150	155	160	
tgg act caa agg caa tgg gat acc atc ata ttc agc gat gaa gct aaa			940
Trp Thr Gln Arg Gln Trp Asp Thr Ile Ile Phe Ser Asp Glu Ala Lys			

165	170	175	
ttt gat gtt agt gtc ggc gat acg aga aaa cgc gtc atc cgt aag agg			988
Phe Asp Val Ser Val Gly Asp Thr Arg Lys Arg Val Ile Arg Lys Arg			
180	185	190	
tca gaa aca tac cat aaa gac tgc ctt aaa aga aca aca aag ttt cct			1036
Ser Glu Thr Tyr His Lys Asp Cys Leu Lys Arg Thr Thr Lys Phe Pro			
195	200	205	210
gcg agc act atg gta tgg gga tgt atg tct gcc aaa gga tta gga aaa			1084
Ala Ser Thr Met Val Trp Gly Cys Met Ser Ala Lys Gly Leu Gly Lys			
	215	220	225
ctt cat ttc att gaa ggg aca gtt aat gct gaa aaa tat att aat att			1132
Leu His Phe Ile Glu Gly Thr Val Asn Ala Glu Lys Tyr Ile Asn Ile			
230	235	240	
tta caa gat agt ttg ttg cca tca ata cca aaa cta tta gat tgc ggt			1180
Leu Gln Asp Ser Leu Leu Pro Ser Ile Pro Lys Leu Leu Asp Cys Gly			
245	250	255	
gaa ttc act ttt cag cag gac gga gca tca tog cac aca gcc aag cga			1228
Glu Phe Thr Phe Gln Gln Asp Gly Ala Ser Ser His Thr Ala Lys Arg			
260	265	270	
acc aaa aat tgg ctg caa tat aat caa atg gag gtt tta gat tgg cca			1276
Thr Lys Asn Trp Leu Gln Tyr Asn Gln Met Glu Val Leu Asp Trp Pro			
275	280	285	290
tca aat agt cca gat cta agc cca att gaa aat att tgg tgg cta atg			1324
Ser Asn Ser Pro Asp Leu Ser Pro Ile Glu Asn Ile Trp Trp Leu Met			
295	300	305	
aaa aac cag ctt cga aat gag cca caa agg aat att tct gac ttg aaa			1372
Lys Asn Gln Leu Arg Asn Glu Pro Gln Arg Asn Ile Ser Asp Leu Lys			

310	315	320	
atc aag ttg caa gag atg tgg gac tca att tct caa gag cat tgc aaa			1420
Ile Lys Leu Gln Glu Met Trp Asp Ser Ile Ser Gln Glu His Cys Lys			
325	330	335	
aat ttg tta agc tca atg cca aaa cga gtt aaa tgc gta atg cag gcc			1468
Asn Leu Leu Ser Ser Met Pro Lys Arg Val Lys Cys Val Met Gln Ala			
340	345	350	
aag ggc gac gtt aca caa ttc taatattaat taaattattg titttaagtat			1519
Lys Gly Asp Val Thr Gln Phe			
355	360		
gatagtaaat cacattacgc cgcgttcgaa ttaatagtgg tcactttttt cttatctctt			1579
aagcaaaccg tttgaataaa ttactcatat ttttgttggtt gttggaaata gagcaaaact			1639
ttttttttcg tcgtgaagag aataaaattc tctttgagac gaaatgcatt ggtatgtgtt			1699
atcttttagta gtattgataa tatagtgtgt taaacattgc gcactgcaaa aaaaacatgc			1759
tgttcgaatt aatagtgggtt ggggctcgta tattatatat ta			1801

<210> 13

<211> 361

<212> PRT

<213> Drosophila hydei

<400> 13

Met	Ser	Gln	Tyr	Ser	Met	Gln	Lys	Asn	Phe	Arg	Leu	Leu	Gln	Ile	Ser
1				5				10					15		

Arg Ser Leu Ala Thr Met Val Arg Gly Lys Pro Ile Ser Lys Glu Ile
20 25 30

Arg Val Leu Ile Arg Asp Tyr Phe Lys Ser Gly Lys Thr Leu Thr Glu
35 40 45

Ile Ser Lys Gln Leu Asn Leu Pro Lys Ser Ser Val His Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Phe Lys Lys Asn Gly Asn Ile Glu Asn Asn Ile Ala Asn Arg
65 70 75 80

Gly Arg Thr Ser Ala Ile Thr Pro Arg Asp Lys Arg Gln Leu Ala Lys
85 90 95

Ile Val Lys Ala Asp Arg Arg Gln Ser Leu Arg Asn Leu Ala Ser Lys
100 105 110

Trp Ser Gln Gln Leu Ala Lys Leu Ser Ser Glu Ser Gly Arg Asp Lys
115 120 125

Leu Lys Ser Ile Gly Tyr Gly Phe Tyr Lys Ala Lys Glu Lys Pro Leu
130 135 140

Leu Thr Leu Arg Gln Lys Lys Lys Arg Leu Gln Trp Ala Arg Glu Arg
145 150 155 160

Met Ser Trp Thr Gln Arg Gln Trp Asp Thr Ile Ile Phe Ser Asp Glu
165 170 175

Ala Lys Phe Asp Val Ser Val Gly Asp Thr Arg Lys Arg Val Ile Arg
180 185 190

Lys Arg Ser Glu Thr Tyr His Lys Asp Cys Leu Lys Arg Thr Thr Lys
195 200 205

Phe Pro Ala Ser Thr Met Val Trp Gly Cys Met Ser Ala Lys Gly Leu
210 215 220

Gly Lys Leu His Phe Ile Glu Gly Thr Val Asn Ala Glu Lys Tyr Ile
225 230 235 240

Asn Ile Leu Gln Asp Ser Leu Leu Pro Ser Ile Pro Lys Leu Leu Asp
245 250 255

Cys Gly Glu Phe Thr Phe Gln Gln Asp Gly Ala Ser Ser His Thr Ala
260 265 270

Lys Arg Thr Lys Asn Trp Leu Gln Tyr Asn Gln Met Glu Val Leu Asp
275 280 285

Trp Pro Ser Asn Ser Pro Asp Leu Ser Pro Ile Glu Asn Ile Trp Trp
290 295 300

Leu Met Lys Asn Gln Leu Arg Asn Glu Pro Gln Arg Asn Ile Ser Asp
305 310 315 320

Leu Lys Ile Lys Leu Gln Glu Met Trp Asp Ser Ile Ser Gln Glu His
325 330 335

Cys Lys Asn Leu Leu Ser Ser Met Pro Lys Arg Val Lys Cys Val Met
340 345 350

Gln Ala Lys Gly Asp Val Thr Gln Phe
355 360

<210> 14

<211> 1801

<212> DNA

<213> Drosophila hydei

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(1787)

<223> /note="transposon"

<220>

<221> CDS

<222> (347)..(760)

<220>

<221> CDS

<222> (821)..(1489)

<300>

<308> Z29102

<309> 1994-07-01

<313> (1)..(1801)

<400> 14

```

gttagcagct tctacgagcc ccaaccacta ttaattcgaa cagcatgttt tttttgcagt      60

gogcaatgtt taacacacta tattatcaat actactaaag ataacacata ccaatgcatt      120

tcgtctcaaa gagaatttta ttctcttcac gacgaaaaaa aaagttttgc tctatttcca      180

acaacaacaa aaatatgagt aatttattca aacggtttgc ttaagagata agaaaaaagt      240

gaccactatt aattcgaacg cggcgtaagc ttaccttaat ctcaagaaga gcaaaacaaa      300

agcaactaat gtaacggaat cattatctag ttatgatctg caaata atg tca caa      355
                               Met Ser Gln
                               1

tac agc atg caa aaa aat ttt aga ttg ctg cag atc agt aga agt tta      403
Tyr Ser Met Gln Lys Asn Phe Arg Leu Leu Gln Ile Ser Arg Ser Leu
      5              10              15

gca acg atg gtt cgt ggt aaa cct att tct aaa gaa atc aga gta ttg      451
Ala Thr Met Val Arg Gly Lys Pro Ile Ser Lys Glu Ile Arg Val Leu
      20              25              30              35

att agg gat tat ttt aaa tot gga aag aca ctt acg gag ata agc aag      499
Ile Arg Asp Tyr Phe Lys Ser Gly Lys Thr Leu Thr Glu Ile Ser Lys
              40              45              50

caa tta aat ttg cct aag tog tot gtg cat ggg gtg ata caa att ttc      547
Gln Leu Asn Leu Pro Lys Ser Ser Val His Gly Val Ile Gln Ile Phe
              55              60              65

aaa aaa aat ggg aat att gaa aat aac att gcg aat aga ggc oga aca      595

```

Lys Lys Asn Gly Asn Ile Glu Asn Asn Ile Ala Asn Arg Gly Arg Thr	
70 75 80	
tca gca ata aca ccc cgc gac aaa aga caa ctg gcc aaa att gtt aag	643
Ser Ala Ile Thr Pro Arg Asp Lys Arg Gln Leu Ala Lys Ile Val Lys	
85 90 95	
gct gat cgt cgc caa tot ttg aga aat ttg gct tct aag tgg tcg cag	691
Ala Asp Arg Arg Gln Ser Leu Arg Asn Leu Ala Ser Lys Trp Ser Gln	
100 105 110 115	
caa ttg gca aaa ctg tca agc gag agt gga cgc gac aaa tta aaa agt	739
Gln Leu Ala Lys Leu Ser Ser Glu Ser Gly Arg Asp Lys Leu Lys Ser	
120 125 130	
att gga tat ggt ttt tat aaa gtatgttttg ttattacctg tgcacgtac	790
Ile Gly Tyr Gly Phe Tyr Lys	
135	
ccaataactt actcgtaatc ttactcgtag gcc aag gaa aaa ccc ttg ctt acg	844
Ala Lys Glu Lys Pro Leu Leu Thr	
140 145	
ctt cgt caa aaa aag aag cgt ttg caa tgg gct cgg gaa agg atg tct	892
Leu Arg Gln Lys Lys Lys Arg Leu Gln Trp Ala Arg Glu Arg Met Ser	
150 155 160	
tgg act caa agg caa tgg gat acc atc ata ttc agc gat gaa gct aaa	940
Trp Thr Gln Arg Gln Trp Asp Thr Ile Ile Phe Ser Asp Glu Ala Lys	
165 170 175	
ttt gat gtt agt gtc ggc gat acg aga aaa cgc gtc atc cgt aag agg	988
Phe Asp Val Ser Val Gly Asp Thr Arg Lys Arg Val Ile Arg Lys Arg	
180 185 190	
tca gaa aca tac cat aaa gac tgc ctt aaa aga aca aca aag ttt cct	1036

Asn Leu Leu Ser Ser Met Pro Lys Arg Val Lys Cys Val Met Gln Ala

340

345

350

aag ggc gac gtt aca caa ttc taatattaat taaattattg ttttaagtat 1519

Lys Gly Asp Val Thr Gln Phe

355

360

gatagtaaata cacattacgc cgcgttcgaa ttaatagtgg tcactttttt cttatctctt 1579

aagcaaaccg tttgaataaa ttactcatat ttttggtgtt gttggaaata gagcaaaact 1639

ttttttttcg tcgtgaagag aataaaattc tctttgagac gaaatgcatt ggtatgtgtt 1699

atcttttagta gtattgataa tatagtgtgt taaacattgc gcactgcaaa aaaaacatgc 1759

tggtcgaatt aatagtgggt ggggctcgta aagctaacta ta 1801

<210> 15

<211> 361

<212> PRT

<213> Drosophila hydei

<400> 15

Met Ser Gln Tyr Ser Met Gln Lys Asn Phe Arg Leu Leu Gln Ile Ser

1

5

10

15

Arg Ser Leu Ala Thr Met Val Arg Gly Lys Pro Ile Ser Lys Glu Ile

20

25

30

Arg Val Leu Ile Arg Asp Tyr Phe Lys Ser Gly Lys Thr Leu Thr Glu

35

40

45

Ile Ser Lys Gln Leu Asn Leu Pro Lys Ser Ser Val His Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Phe Lys Lys Asn Gly Asn Ile Glu Asn Asn Ile Ala Asn Arg
65 70 75 80

Gly Arg Thr Ser Ala Ile Thr Pro Arg Asp Lys Arg Gln Leu Ala Lys
85 90 95

Ile Val Lys Ala Asp Arg Arg Gln Ser Leu Arg Asn Leu Ala Ser Lys
100 105 110

Trp Ser Gln Gln Leu Ala Lys Leu Ser Ser Glu Ser Gly Arg Asp Lys
115 120 125

Leu Lys Ser Ile Gly Tyr Gly Phe Tyr Lys Ala Lys Glu Lys Pro Leu
130 135 140

Leu Thr Leu Arg Gln Lys Lys Lys Arg Leu Gln Trp Ala Arg Glu Arg
145 150 155 160

Met Ser Trp Thr Gln Arg Gln Trp Asp Thr Ile Ile Phe Ser Asp Glu
165 170 175

Ala Lys Phe Asp Val Ser Val Gly Asp Thr Arg Lys Arg Val Ile Arg
180 185 190

Lys Arg Ser Glu Thr Tyr His Lys Asp Cys Leu Lys Arg Thr Thr Lys
195 200 205

Phe Pro Ala Ser Thr Met Val Trp Gly Cys Met Ser Ala Lys Gly Leu
210 215 220

Gly Lys Leu His Phe Ile Glu Gly Thr Val Asn Ala Glu Lys Tyr Ile
225 230 235 240

Asn Ile Leu Gln Asp Ser Leu Leu Pro Ser Ile Pro Lys Leu Ser Asp
245 250 255

Cys Gly Glu Phe Thr Phe Gln Gln Asp Gly Ala Ser Ser His Thr Ala
260 265 270

Lys Arg Thr Lys Asn Trp Leu Gln Tyr Asn Gln Met Glu Val Leu Asp
275 280 285

Trp Pro Ser Asn Ser Pro Asp Leu Ser Pro Ile Glu Asn Ile Trp Trp
290 295 300

Leu Met Lys Asn Gln Leu Arg Asn Glu Pro Gln Arg Asn Ile Ser Asp
305 310 315 320

Leu Lys Ile Lys Leu Gln Glu Met Trp Asp Ser Ile Ser Gln Glu His
325 330 335

Cys Lys Asn Leu Leu Ser Ser Met Pro Lys Arg Val Lys Cys Val Met
 340 345 350

Gln Ala Lys Gly Asp Val Thr Gln Phe
 355 360

<210> 16
 <211> 1635
 <212> DNA
 <213> Haematobia irritans

<220>
 <221> CDS
 <222> (329)..(1366)

<400> 16
 aaaatattgtg attaccgtta tagcggaata tatattcaga gagattagtt tactttaata 60
 gcgtacataa agttttttga cctgattttt actctttctt cactattttg taaacactga 120
 attaggattt gcgaatttat atggaaggaa atatctagaa caaacataaa caaagagata 180
 ttgagagtaa catgttggct gataagtccc cggtttgaca ctagtattaa atgcatatta 240
 tttttatata ggaccaacct tcaaatgatt cgtgtcaaaa ttgacgtca attagtttgt 300
 gagagcaact tttgttattg tgaagaaa atg gaa aaa gaa ttt cgt gtt ttg 352
 Met Glu Lys Glu Phe Arg Val Leu
 1 5
 ata aaa tac tgt ttt ctg aag gga aaa aat gcg gtg gaa gca aaa agt 400
 Ile Lys Tyr Cys Phe Leu Lys Gly Lys Asn Ala Val Glu Ala Lys Ser

10	15	20	
tgg ctt gat aat gag ttt cgg gac tct gcc cca agg aaa tca ata ata			448
Trp Leu Asp Asn Glu Phe Pro Asp Ser Ala Pro Arg Lys Ser Ile Ile			
25	30	35	40
att gat tgg tat gca aaa ttc aag cga ggt gaa atg agc acg gag gac			496
Ile Asp Trp Tyr Ala Lys Phe Lys Arg Gly Glu Met Ser Thr Glu Asp			
45	50	55	
ggt gaa cgc agt gga cgc cgg aaa gag gtg gtt acc gac gaa aac atc			544
Gly Glu Arg Ser Gly Arg Pro Lys Glu Val Val Thr Asp Glu Asn Ile			
60	65	70	
aaa aaa atc cac aaa atg att ttg aat gac cgt aaa atg aag ttg atc			592
Lys Lys Ile His Lys Met Ile Leu Asn Asp Arg Lys Met Lys Leu Ile			
75	80	85	
gag ata aca aag gcc tta aac ata tca aag gaa cgt gtt ggt cat atc			640
Glu Ile Thr Lys Ala Leu Asn Ile Ser Lys Glu Arg Val Gly His Ile			
90	95	100	
att cat caa tat ttg gat atg cgg aag ctc tgt gca aaa tgg gtg cgg			688
Ile His Gln Tyr Leu Asp Met Arg Lys Leu Cys Ala Lys Trp Val Pro			
105	110	115	120
cgc gaa ctc aca ttt gac caa aaa caa caa cgt gtt gat gat tct gag			736
Arg Glu Leu Thr Phe Asp Gln Lys Gln Gln Arg Val Asp Asp Ser Glu			
125	130	135	
cgg tgt ttg cag ctg tta act cgt aat aca ccc gag ttt ttc cgt cga			784
Arg Cys Leu Gln Leu Leu Thr Arg Asn Thr Pro Glu Phe Phe Arg Arg			
140	145	150	
tat gta aca atg gat gaa aca tgg ctc cat cac tac act cct gag ttc			832
Tyr Val Thr Met Asp Glu Thr Trp Leu His His Tyr Thr Pro Glu Phe			

155	160	165	
gat caa cag tct gct gag tgg aca gcg acc ggt gaa ccg tct ccg aag			880
Asp Gln Gln Ser Ala Glu Trp Thr Ala Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys			
170	175	180	
cgt gga aag act caa aag tcc gct ggc aaa gta atg gcc tct gtt ttt			928
Arg Gly Lys Thr Gln Lys Ser Ala Gly Lys Val Met Ala Ser Val Phe			
185	190	195	200
tgg aat gcg cat gga ata att ttt atc gat tat ctt gag aag gaa aaa			976
Trp Asn Ala His Gly Ile Ile Phe Ile Asp Tyr Leu Glu Lys Glu Lys			
205	210	215	
acc atc aac agt gac tat tat atg gcg tta ttg gag cgt ttg aag gtc			1024
Thr Ile Asn Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Leu Leu Glu Arg Leu Lys Val			
220	225	230	
gaa atc gcg gca aaa tgg ccc cat atg aag aag aaa aaa gtg ttg ttc			1072
Glu Ile Ala Ala Lys Trp Pro His Met Lys Lys Lys Lys Val Leu Phe			
235	240	245	
gac caa gac aat gca ccg tgc cac aag tca gta aga acg atg gca aaa			1120
Asp Gln Asp Asn Ala Pro Cys His Lys Ser Val Arg Thr Met Ala Lys			
250	255	260	
att cat gaa ttg ggc ttc gaa ttg ctt ccc cac cca cta tat tct cca			1168
Ile His Glu Leu Gly Phe Glu Leu Leu Pro His Pro Leu Tyr Ser Pro			
265	270	275	280
gat ctg gcc ccc agc gaa ttt ttc ttg ttc tca gac ctc aaa agg ctc			1216
Asp Leu Ala Pro Ser Glu Phe Phe Leu Phe Ser Asp Leu Lys Arg Leu			
285	290	295	
gca ggg aaa aaa ttt ggc tgc aat gaa gag gta atc gcc gaa act aag			1264
Ala Gly Lys Lys Phe Gly Cys Asn Glu Glu Val Ile Ala Glu Thr Lys			

300	305	310	
gcc tat ttt gag gca aaa ccg aaa gag tac tac caa aat ggt atc aaa			1312
Ala Tyr Phe Glu Ala Lys Pro Lys Glu Tyr Tyr Gln Asn Gly Ile Lys			
315	320	325	
aaa ttg gaa ggt cgt tat aat cgt ggt atc gct ctt gaa ggg gac tat			1360
Lys Leu Glu Gly Arg Tyr Asn Arg Gly Ile Ala Leu Glu Gly Asp Tyr			
330	335	340	
ggt gaa taataaaaac gaattttgac aaaaaatgtg tttttctttg ttagaccggg			1416
Val Glu			
345			
gaattatcac ccaacctgtt aaaaactgtt actttttgtt aaagtaagtc agaataaaac			1476
aaatatttga atttttggag gtgtacgtaa acttctttga ttcactgtat atatttttaa			1536
gcttcacaat aaagtacaca cttgtagagt taaaatcgtc tcgtcttctc ttttactaaa			1596
tacaacatgg tgtcagaagg tgtgtgaagt ctaattaaa			1635

<210> 17

<211> 346

<212> PRT

<213> Haematobia irritans

<400> 17

Met	Glu	Lys	Glu	Phe	Arg	Val	Leu	Ile	Lys	Tyr	Cys	Phe	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	

Lys	Asn	Ala	Val	Glu	Ala	Lys	Ser	Trp	Leu	Asp	Asn	Glu	Phe	Pro	Asp
				20					25					30	

Ser Ala Pro Arg Lys Ser Ile Ile Ile Asp Trp Tyr Ala Lys Phe Lys

35

40

45

Arg Gly Glu Met Ser Thr Glu Asp Gly Glu Arg Ser Gly Arg Pro Lys

50

55

60

Glu Val Val Thr Asp Glu Asn Ile Lys Lys Ile His Lys Met Ile Leu

65

70

75

80

Asn Asp Arg Lys Met Lys Leu Ile Glu Ile Thr Lys Ala Leu Asn Ile

85

90

95

Ser Lys Glu Arg Val Gly His Ile Ile His Gln Tyr Leu Asp Met Arg

100

105

110

Lys Leu Cys Ala Lys Trp Val Pro Arg Glu Leu Thr Phe Asp Gln Lys

115

120

125

Gln Gln Arg Val Asp Asp Ser Glu Arg Cys Leu Gln Leu Leu Thr Arg

130

135

140

Asn Thr Pro Glu Phe Phe Arg Arg Tyr Val Thr Met Asp Glu Thr Trp

145

150

155

160

Leu His His Tyr Thr Pro Glu Phe Asp Gln Gln Ser Ala Glu Trp Thr

165

170

175

Ala Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Gly Lys Thr Gln Lys Ser Ala

180

185

190

Gly Lys Val Met Ala Ser Val Phe Trp Asn Ala His Gly Ile Ile Phe

195

200

205

Ile Asp Tyr Leu Glu Lys Glu Lys Thr Ile Asn Ser Asp Tyr Tyr Met

210

215

220

Ala Leu Leu Glu Arg Leu Lys Val Glu Ile Ala Ala Lys Trp Pro His

225

230

235

240

Met Lys Lys Lys Lys Val Leu Phe Asp Gln Asp Asn Ala Pro Cys His

245

250

255

Lys Ser Val Arg Thr Met Ala Lys Ile His Glu Leu Gly Phe Glu Leu

260

265

270

Leu Pro His Pro Leu Tyr Ser Pro Asp Leu Ala Pro Ser Glu Phe Phe

275

280

285

Leu Phe Ser Asp Leu Lys Arg Leu Ala Gly Lys Lys Phe Gly Cys Asn

290

295

300

Glu Glu Val Ile Ala Glu Thr Lys Ala Tyr Phe Glu Ala Lys Pro Lys

305

310

315

320

Glu Tyr Tyr Gln Asn Gly Ile Lys Lys Leu Glu Gly Arg Tyr Asn Arg
 325 330 335

Gly Ile Ala Leu Glu Gly Asp Tyr Val Glu
 340 345

<210> 18
 <211> 1543
 <212> DNA
 <213> Chrysoperla plorabunda

<220>
 <221> source
 <222> (146)..(1442)
 <223> /transposon="mariner transposon"

<220>
 <221> CDS
 <222> (327)..(1373)

<300>
 <308> U11652
 <309> 1995-12-16
 <313> (1)..(1543)

<400> 18
 ccttaaattt atttgtattg atttgaagct taaaaaatgt atacaatttt aaagaaagct 60
 gaaagtattc togaactaac gtggagaatt tattacgaat ttttgggtgt gattgtaatt 120
 gcttgcttaa tatcggctct ctgtatatta ggttggctga taagtccccg gtctgacaca 180

tagatggcgt cgotagtatt aaatgcata ttttttata tagtaccaac cttcaaatga	240
ttcgtgtcaa aatttgacgt ctgtaagtca attagtttgt gagatagagc gtcttttgtg	300
aagcaacttt tgttattgtg aaaaaa atg gaa aaa aag gaa ttt cgt gtt ttg	353
Met Glu Lys Lys Glu Phe Arg Val Leu	
1 5	
ata aaa tac tgt ttt ctg aag gga aaa aat aca gtg gaa gca aaa act	401
Ile Lys Tyr Cys Phe Leu Lys Gly Lys Asn Thr Val Glu Ala Lys Thr	
10 15 20 25	
tgg ctt gat aat gag ttt ccg gac tct gcc cca ggg aaa tca aca ata	449
Trp Leu Asp Asn Glu Phe Pro Asp Ser Ala Pro Gly Lys Ser Thr Ile	
30 35 40	
att gat tgg tat gca aaa ttc aag cgt ggt gaa atg agc acg gag gac	497
Ile Asp Trp Tyr Ala Lys Phe Lys Arg Gly Glu Met Ser Thr Glu Asp	
45 50 55	
ggt gaa cgc agt gga cgc ccg aaa gag gtg gtt acc gac gaa aac atc	545
Gly Glu Arg Ser Gly Arg Pro Lys Glu Val Val Thr Asp Glu Asn Ile	
60 65 70	
aaa aaa atc cac aaa atg att ttg aat gac cgt aaa atg aag ttg atc	593
Lys Lys Ile His Lys Met Ile Leu Asn Asp Arg Lys Met Lys Leu Ile	
75 80 85	
gag ata gca gag gcc tta aag ata tca aag gaa cgt gtt ggt cat atc	641
Glu Ile Ala Glu Ala Leu Lys Ile Ser Lys Glu Arg Val Gly His Ile	
90 95 100 105	
att cat caa tat ttg gat atg cgg aag ctc tgt gca aaa tgg gtg ccg	689
Ile His Gln Tyr Leu Asp Met Arg Lys Leu Cys Ala Lys Trp Val Pro	
110 115 120	

<p> cgc gag ctc aca ttt gac caa aaa caa caa cgt gtt gat gat tct gag Arg Glu Leu Thr Phe Asp Gln Lys Gln Gln Arg Val Asp Asp Ser Glu 125 130 135 </p>	737
<p> cgg tgt ttg cag ctg tta act cgt aat aca ccc gag ttt ttg cgt cga Arg Cys Leu Gln Leu Leu Thr Arg Asn Thr Pro Glu Phe Leu Arg Arg 140 145 150 </p>	785
<p> tat gtg aca atg gat gaa aca tgg ctc cat cac tac act cct gag tcc Tyr Val Thr Met Asp Glu Thr Trp Leu His His Tyr Thr Pro Glu Ser 155 160 165 </p>	833
<p> aaa cga cag tcg gct gag tgg aca gcg acc ggt gaa cgg tct cgg aag Lys Arg Gln Ser Ala Glu Trp Thr Ala Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys 170 175 180 185 </p>	881
<p> cgt gga aag act caa aag tcc gct ggc aaa gta atg gcc tct gtt ttt Arg Gly Lys Thr Gln Lys Ser Ala Gly Lys Val Met Ala Ser Val Phe 190 195 200 </p>	929
<p> ttc gat gcg cat gga ata att ttt atc gat tat ctt gag aag gga aaa Phe Asp Ala His Gly Ile Ile Phe Ile Asp Tyr Leu Glu Lys Gly Lys 205 210 215 </p>	977
<p> acc atc aac agt gac tat tat atg gcg tta ttg gag cgt ttg aag gtc Thr Ile Asn Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Leu Leu Glu Arg Leu Lys Val 220 225 230 </p>	1025
<p> gaa atc gcg gca aaa cgg ccc cat atg aag aag aaa aaa gtg ttg ttc Glu Ile Ala Ala Lys Arg Pro His Met Lys Lys Lys Lys Val Leu Phe 235 240 245 </p>	1073
<p> cac caa gac aac gca cgg tgc cac aag tca ttg aga acg atg gca aaa His Gln Asp Asn Ala Pro Cys His Lys Ser Leu Arg Thr Met Ala Lys 250 255 260 265 </p>	1121

att cat gaa ttg ggc ttc gaa ttg ctt ccc cac cca ccg tat tct cca 1169
 Ile His Glu Leu Gly Phe Glu Leu Leu Pro His Pro Pro Tyr Ser Pro
 270 275 280

gat ctg gcc ccc agc gac ttt ttc ttg ttc tca gac ctc aaa agg atg 1217
 Asp Leu Ala Pro Ser Asp Phe Phe Leu Phe Ser Asp Leu Lys Arg Met
 285 290 295

ctc gca ggg aaa aaa ttt ggc tgc aat gaa gag gtg atc gcc gaa act 1265
 Leu Ala Gly Lys Lys Phe Gly Cys Asn Glu Glu Val Ile Ala Glu Thr
 300 305 310

gag gcc tat ttt gag gca aaa ccg aag gag tac tac caa aat ggt atc 1313
 Glu Ala Tyr Phe Glu Ala Lys Pro Lys Glu Tyr Tyr Gln Asn Gly Ile
 315 320 325

aaa aaa ttg gaa ggt cgt tat aat cgt tgt atc gct ctt gaa ggg aac 1361
 Lys Lys Leu Glu Gly Arg Tyr Asn Arg Cys Ile Ala Leu Glu Gly Asn
 330 335 340 345

tat gtt gaa taa taaaaacgaa ttttcacaaa aaaatgtgtt tttctttgtt 1413
 Tyr Val Glu

agaccgggga cttatcagcc aacctgttat cttgacgaaa aaatgaatgg tcgataaata 1473

atgtgatgtg atccttactg tgttcaattg actggacgaa accgttatga tcaatttgga 1533

tgccataaac 1543

<210> 19

<211> 348

<212> PRT

<213> Chrysoperla plorabunda

<400> 19

Met Glu Lys Lys Glu Phe Arg Val Leu Ile Lys Tyr Cys Phe Leu Lys
1 5 10 15

Gly Lys Asn Thr Val Glu Ala Lys Thr Trp Leu Asp Asn Glu Phe Pro
20 25 30

Asp Ser Ala Pro Gly Lys Ser Thr Ile Ile Asp Trp Tyr Ala Lys Phe
35 40 45

Lys Arg Gly Glu Met Ser Thr Glu Asp Gly Glu Arg Ser Gly Arg Pro
50 55 60

Lys Glu Val Val Thr Asp Glu Asn Ile Lys Lys Ile His Lys Met Ile
65 70 75 80

Leu Asn Asp Arg Lys Met Lys Leu Ile Glu Ile Ala Glu Ala Leu Lys
85 90 95

Ile Ser Lys Glu Arg Val Gly His Ile Ile His Gln Tyr Leu Asp Met
100 105 110

Arg Lys Leu Cys Ala Lys Trp Val Pro Arg Glu Leu Thr Phe Asp Gln
115 120 125

Lys Gln Gln Arg Val Asp Asp Ser Glu Arg Cys Leu Gln Leu Leu Thr

130

135

140

Arg Asn Thr Pro Glu Phe Leu Arg Arg Tyr Val Thr Met Asp Glu Thr

145

150

155

160

Trp Leu His His Tyr Thr Pro Glu Ser Lys Arg Gln Ser Ala Glu Trp

165

170

175

Thr Ala Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Gly Lys Thr Gln Lys Ser

180

185

190

Ala Gly Lys Val Met Ala Ser Val Phe Phe Asp Ala His Gly Ile Ile

195

200

205

Phe Ile Asp Tyr Leu Glu Lys Gly Lys Thr Ile Asn Ser Asp Tyr Tyr

210

215

220

Met Ala Leu Leu Glu Arg Leu Lys Val Glu Ile Ala Ala Lys Arg Pro

225

230

235

240

His Met Lys Lys Lys Lys Val Leu Phe His Gln Asp Asn Ala Pro Cys

245

250

255

His Lys Ser Leu Arg Thr Met Ala Lys Ile His Glu Leu Gly Phe Glu

260

265

270

Leu Leu Pro His Pro Pro Tyr Ser Pro Asp Leu Ala Pro Ser Asp Phe

275

280

285

Phe Leu Phe Ser Asp Leu Lys Arg Met Leu Ala Gly Lys Lys Phe Gly

290

295

300

Cys Asn Glu Glu Val Ile Ala Glu Thr Glu Ala Tyr Phe Glu Ala Lys

305

310

315

320

Pro Lys Glu Tyr Tyr Gln Asn Gly Ile Lys Lys Leu Glu Gly Arg Tyr

325

330

335

Asn Arg Cys Ile Ala Leu Glu Gly Asn Tyr Val Glu

340

345

<210> 20

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IR/DR-R

<400> 20

aattccatca caaagctctg acctcaatcc tatagaaagg aggaatgagc caaaattcac 60

ccaacttatt gtgggaagct tgtggaaggc tactcgaaat gtttgaccca agttaaacaa 120

tttaaaggca atgctaccaa atactaattg agtgtatgtt aacttctgac ccactgggaa 180

tgtgatgaaa gaaataaaaag ctgaaatgaa tcattototo tactattatt ctgatatttc 240

acattcttaa aataaagtg tgatcctaac tgaccttaag acagggaatc tttactcgga 300

ttaaagtgtca ggaattgtga aaaagtgagt ttaaagtgtat ttggctaagg tgtatgtaaa 360

cttccgactt caactgta 378

<210> 21

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IR/DR-L

<400> 21

cottgaaata catccacagg tacacctcca attgaactcaa atgatgtcaa ttagtctatc 60

agaagcttct aaagccatga catcattttc tggaattttc caagctgttt aaaggcacag 120

tcaacttagt gtatgtaaac ttctgacctc ctggaattgt gatacagtga attataagtg 180

aaataatctg totgtaaaca attgttggaa aaatgacttg tgtcatgcac aaagtagatg 240

tcctaactga ctggccaaaa ctattgtttg ttaacaagaa atttgtggag tagttgaaaa 300

acgagtttta atgactccaa ctttaagtgtg tgtaaaactc cgacttcaac tgta 354

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' outer repeat

<400> 22

gttcaagtcg gaagtttaca tacacttag

29

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' inner repeat

<400> 23

cagtgggtca gaagtttaca tacactaagg

30

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' inner repeat

<400> 24

cagtgggtca gaagttaaca tacactcaat t

31

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' outer repeat

<400> 25

agttgaatcg gaagtttaca tacaccttag

30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> preferred consensus direct repeat

<400> 26

caktgrgtcr gaagtttaca tacacttaag

30

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> inverted repeat sequence

<400> 27

gttgaagtcg gaagtttaca cttagg .

26

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> inverted repeat sequence

<400> 28

ccagtgggtc aggaagttta catacactaa g

31

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward sequence used for PCR amplification from pCMV-SB

<400> 29

catgccatgg gaaaatcaaa agaaatc

27

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> reverse sequence used for PCR amplification from pCMV-SB

<400> 30

ccgctcgagc agtggcttct tccttg

26

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer EGFP-1U

<400> 31

caccctcgtg accaccctga cctac

25

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer EGFP-1L

<400> 32

cttgatgcgc ttctttctgct tgtcg

25

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer HYG-1U

<400> 33

cgggcgtata tgcctcccat tggctcttgac

30

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer TK-1L

<400> 34

tggtgtagat gttcgcgatt gtctoggaag

30

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer M13F

<400> 35

acgacgttgt aaaacgacgg ccagt

25

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer RMCE-DL1

<400> 36

gcacgcgcacat gggtcacgac gagatccic

29

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> RRMCE-IL-1

<400> 37

aagtgagttt aaatgtattt ggctaagggtg

30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TgTP-2L

<400> 38

acacaggaaa cagctatgac catgattacg

30

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer neo-U1

<400> 39

gggtggagag gctattcggc tatga

25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer neo-L1

<400> 40

tggatacttt ctcggcagga gcaag

25

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> connected to FITC

<400> 41

cgccgcgtct agcggtaccc tac

23

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> connected to LCR640

<400> 42

gtaggggatc gacctcgagg gg

22

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (1)

<223> connected to FITC

<400> 43

gctgtgctcg acgttgtcac tgaag

25

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (1)

<223> connected to LCR640

<400> 44

gggaaggac tggctgctat tggg

24

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

gttgggtcgt ttgttcggat

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cgcgcaatta accctcacta

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

aatgaactgc aggacgaggc

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 48

atggatactt tctoggcagg

20

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer LCB2XL2

<400> 49

ttccaaaaga agtagagtgg agaaccagtg

30

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer PGK2

<400> 50

aggccacttg tgtagcgcca agt

23

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer LCB2XL1

<400> 51

ccaaccaa at acatttaaca tattctaggt

30

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer PGK4

<400> 52

gotgctaaag cgcattgctcc agactg .

26

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward primer for amplification of SB transposase gene

<400> 53

aatagaactg tttggccata atgaccatcg

30

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> reverse primer for amplification of SB transposase gene

<400> 54

atccacataa ttttccttcc tcatg

25

<210> 55

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward primer for amplification of beta actin transposase gene

<400> 55

cagggtgtga tggtaggaat gggtcagaag

30

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> reverse primer for amplification of beta actin transposase gene

<400> 56

tacgtacatg gctgggggtgt tgaaggtotc

30

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer beta geo

<400> 57

tgccagtttg aggggacgac gacagtatcg

30

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MS specific primer

<400> 58

tggagtgagc tagaatcaga aagatgacac

30

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> M2L specific primer

<400> 59

gactttcaag accttcgacg caccgttcac

30

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> M4 specific primer

<400> 60

tcttcagcca caggctccca gacatgacag

30

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> N1 specific primer

<400> 61

gatatgaaga gctgtcagtt tgtagcagtc

30

<210> 62

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Unmet-U

<400> 62

tacagttgaa gtoggaagtt tacatacact taag

34

<210> 63

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Unmet-L

<400> 63

cttaagtgtgta tgtaaaacttc cgacttcaac tgta

34

<210> 64

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Met-U

<220>

<221> misc_feature

<222> (13).. (13)

<223> N is 5-methyl cytosine

<400> 64

tacagttgaa gtnggaagtt tacatacact taag

34

<210> 65

<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Met-L

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> N is 5-methyl cytosine

<400> 65
cttaagtgtgta tgtaaacttc ngacttcaac tgta

34

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> forward primer for amylase 2.1 gene

<400> 66
ccttgtaagg gttggtggag gtcac

25

<210> 67
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> reverse primer for amylase 2.1 gene

<400> 67

cgccactoga acaggtggac aatag

25

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 68

tgcgaggata agaacagaca ctac

24

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 69

acagactcag aagcaaacgt aaga

24

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward primer sequence for IR/DR-L

<400> 70

gcacgggtgt tgggtcgttt gttc

24

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> reverse primer sequence for IR/DR-L

<400> 71

cttctaaagc catgacatca ttttctg

27

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward primer sequence for IR/DR-R

<400> 72

gaaggctact cgaaatgttt gacccaag

28

<210> 73

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> EGFP-1U primer

<400> 73

cacgctgggtg accagcctga ccta

24

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> EGFP-1L primer

<400> 74

cttgatgccg ttctctgctt gtcg

24

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SB-2U primer

<400> 75

tcctagagat gaacgtactt tggt

24

<210> 76

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SB-1L primer

<400> 76

atccagataa ttttccttgc tcatg

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Fischer S.E. et al., Regulated transposition of a fish transposon in the mouse germ line, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2001, Vol.98, No.12, pages 6759 to 6764	26-55 /1-25,57-106
X/A	Horie K. et al., Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner- like transposon Sleeping Beauty in mice, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2001, Vol.98, No.16, pages 9191 to 9196	26-55 /1-25,57-106

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 August, 2004 (25.08.04)

Date of mailing of the international search report
14 September, 2004 (14.09.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/010090

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Luo G. et al., Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1998, Vol.95, No.18, pages 10769 to 10773	1-106
A	Lee S.Y. et al., Efficient Tn10 transposition into a DNA insertion hot spot in vivo requires the 5-methyl groups of symmetrically disposed thymines within the hot-spot consensus sequence, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1987, Vol.84, No.22, pages 7876 to 7880	1-106
A	Woodcock D.M. et al., RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human Ll transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase, Nucleic Acids Res, 1988, Vol.16, No.10, pages 4465 to 4482	1-106
P,X	Yusa K. et al., Enhancement of Sleeping Beauty transposition by CpG methylation: possible role of heterochromatin formation, Mol.Cell Biol., 2004 May, Vol.24, No.9, pages 4004 to 4018	1-106

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Fischer S.E. et al., Regulated transposition of a fish transposon in the mouse germ line, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Vol. 98, No. 12, pp. 6759-6764	26-55 /1-25, 57-106
X/A	Horie K. et al., Efficient chromosomal transposition of a Tcl/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Vol. 98, No. 16, pp. 9191-9196	26-55 /1-25, 57-106

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.08.2004

国際調査報告の発送日 14.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Luo G. et al., Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, Vol.95, No.18, pp.10769-10773	1-106
A	Lee S.Y. et al., Efficient Tn10 transposition into a DNA insertion hot spot in vivo requires the 5-methyl groups of symmetrically disposed thymines within the hot-spot consensus sequence, Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, Vol.84, No.22, pp.7876-7880	1-106
A	Woodcock D.M. et al., RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase, Nucleic Acids Res, 1988, Vol.16, No.10, pp.4465-4482	1-106
P, X	Yusa K. et al., Enhancement of Sleeping Beauty transposition by CpG methylation: possible role of heterochromatin formation, Mol Cell Biol, 2004 May, Vol.24, No.9, pp.4004-4018	1-106

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.